



FI0001015148

(12) PATENTTIJULKAIKU
PATENTSKRIFT

(10) FI 101514 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.07.98

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

A 23J 1/20, 3/08, A 23C 21/00

(21) Patentihakemus - Patentansökaning 944110

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 07.09.94

(24) Alkupäivä - Löpdag 07.09.94

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 24.08.95

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

23.02.94 FI 940846 P

SUOMI-FINLAND
(FI)Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(73) Haltija - Innehavare

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab, Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi
Förfarande för isolering av vassleproteiner

(56) Viitejulkaisut - Anfördra publikationer

Journal of Food Science, vol. 55, nro 6, 1990, J.M.Gonzalez et al.,
"Recovery of Proteins from Sweet Whey Using a solid State Sulfitolysis", p. 1559-1563

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee prosessia ja laitteistoa heraproteiinien eristämiseksi. Prosessi sisältää vaiheet, joissa

a) suoritetaan heran esikäsittely, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,

b) suoritetaan vaiheen a) esikäsittelyyn heran sulfonointikäsittely, jossa esikäsittely hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa oleellisesti ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat, ja

c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsittelyyn heran loppukäsittely, joka ainakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen em. käsittelystä herasta.

Laitteisto käsittää

a) heran syöttö- ja esikäsittelylaitteet, jotka käsittävät heran konsentrointilaitteen (6, 7),

b) proteiinien sulfonointikäsittelylaitteet, jotka käsittävät

b₁) sulfonointireaktoriin (4, 5),b₂) sulfiitin annostelulaitteen (A) jab₃) elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen annostelulaitteen (B), joilla molemmilla annostelulaitteilla (A, B) on yhteys sulfonointireaktoriin (4, 5),

c) sulfonoitujen proteiinien jälkikäsittelylaitteet, jotka käsittävät sulfonoitujen proteiinien erotus- ja talteenotto-laitteet (mm. 10, 13, 14, 15), ja

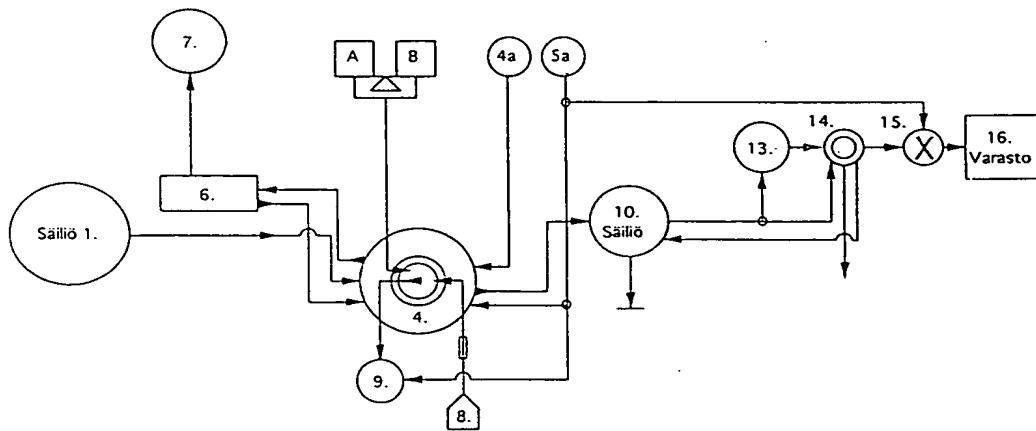
d) johdot kohdan a) heran syöttö- ja esikäsittelylaitteiden (6, 7) ja kohdan b) proteiinien sulfonointilaitteiden (4, 5) välillä sekä kohdan b) proteiinien sulfonointilaitteiden (4, 5) ja kohdan c) sulfonoitujen proteiinien jälkikäsittely-laitteiden (mm. 10, 13, 14, 15) välillä.

Uppfinningen avser en process och en apparatur för isolering av proteiner ur vassla. Processen innehåller stegen, där

- vasslan förbehandlas, vilket åtminstone innehåller koncentrering av vasslan genom avlägsning av 75-95 % av dess vatten,
- den förbehandlade vasslan ur steg a) sulfoneringsbehandlas, varvid den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfit och en oxiderande förening av livsmedelskvalitet utan katalysator och vasslans proteiner sulfoneras, och
- den för- och sulfoneringsbehandlade vasslan ur steg b) slutbehandlas, varvid vasslans sulfonerade proteiner åtminstone separeras ur ovannämnda behandlade vassla.

Apparaturen innehåller

- tillförsel- och förbehandlingsapparater för vasslan, vilka innehåller en koncentringsapparat (6, 7) för vasslan,
- proteinsulfoneringsapparater, som innehåller
 - en sulfoneringsreaktor (4, 5),
 - en sulfitdoseringsapparat (A) och
 - en doseringsapparat (B) för den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet, vilka bågge doseringsapparater (A, B) är förenade med sulfoneringsreaktorn (4, 5),
- efterbehandlingsapparater för de sulfonerade proteinerna, vilka efterbehandlingsapparater innehåller separerings- och tillvaratagningsapparater (bl.a. 10, 13, 14, 15) för de sulfonerade proteinerna, och
- ledningar mellan matnings- och förbehandlingsapparaterna (6, 7) för vasslan i punkt a) och sulfoneringsapparaterna (4, 5) för proteinerna i punkt b) samt mellan sulfoneringsapparaterna (4, 5) för proteinerna i punkt b) och efterbehandlingsapparaterna (bl.a. 10, 13, 14, 15) för de sulfonerade proteinerna i punkt c).



Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi

Keksintö koskee prosessia pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinien eristämiseksi, joka sisältää vaiheet, joissa

5 a) suoritetaan heran esikäsittely, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen veestä,

b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely, ja

c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka

10 ainakin käsittää heran sulfonoidujen proteiinien erottamisen em. käsitellystä herasta konsentroimalla ne, saostamalla ne ja/tai suorittamalla niille fraktiosaostus.

Heraproteiinit ovat muihin ravintoproteiineihin nähden täysin ylivoimaisia, mitä tulee niiden ravintoarvoon ja erityisesti lysiini- ja metioniinipitoisuuteen. Heraproteiinien talteenotto ja käyttö ihmisravinnossa vähentäisi myös juustontuotannon kustannuksia.

15 Vaikka heraproteiinin käytöllä on potentiaalia ihmisravintona, pääesteet näyttävät tällä hetkellä olevan (1) sen talteenottoprosessin ja eri komponenttien erotusprosessin kalleus ja (2) konsentraatin tai isolaatin huonot funktionaaliset ominaisuudet, kuten huono liukoisuus, emulgointikyky, geelinmuodostuskyky ja vaahdonmuodostuskyky.

20 Heran proteiinien eristystä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa nativissa muodossa. Proteiinin eristys tapahtuu neljän päämenetelmän mukaisesti: 1. denaturointi ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiaallinen muuntelu ja saostus.

25 Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on denaturointi eli kuumennus ja pH:n laskeminen happamelle puolelle. Eristys on suoritettavissa taloudellisesti esimerkiksi seuraavasti: hera konsentroidaan noin 20 %:n kuiva-aineepitoisuuteen, pH säädetään välille 6,0-7,0, proteiinit denaturoidaan pitämällä lämpötila 90°C:n yläpuolella 10-30 min, minkä jälkeen proteiinit saostetaan laskemalla pH 4,4-5,0:aan. Tulosena saatu proteiini on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä em. funktionaalista ominaisuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä, esimerkiksi sulatuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto. Hill, et al., Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15, (1982) 155-160.

30 35 Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinikonsentraattina ultrasuodattamalla ja kuivaamalla tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivaamalla. Molemmilla menetmillä on mahdollista saada eristetyt proteiinit funktionaalina. Määrävänenä tekijänä näidenkin tuotantomenetelmien valinnassa on tuotteen funktionaalisuus ja sen tuotantokustannukset.

Proteiinikonsentraattien koostumuksessa, funktioalisuudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu heran erilaisesta koostumuksesta ja esikäsittelyn sekä valmistus- ja käsitteyolosuhteiden erilaisuudesta.

5

Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaihtelua. Ioninvaihtoadsorptiomenetelmä niiden valmistamiseksi tasailee vaihtelua jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin mitä proteiinikonsentraatti on.

10 Julkaisun Morr ja Foegeding, Food Technol. 44 (1990) 100-112, mukaisen aineiston, jossa oli kolme heraproteiini-isolaattia ja kahdeksan konsentraattia, analyysi osoitti näiden eroavan selvästi koostumukseltaan. Konsentraattien ja isolaattien koostumuksen keskimääräiset arvot olivat vastaavasti seuraavat: proteiinipitoisuus 73,8 ja 91,0 %, ei-proteiinityppi 3,10 ja 0,32 %, vesi 5,13 ja 3,75 %, tuhka 4,27 ja 1,82 %, laktoosi 3,92 ja 0,57 % sekä rasva 5,00 ja 0,57 %.

15 Saman julkaisun mukaan isolaatit olivat selvästi funktioalisempia ja laadukkaampia kuin konsentraatit rasvan ja proteiinin määrään nähden sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahdon pysyvyyden, proteiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Konsentraattien suhteellisen korkea laktoosi- ja

20 mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja haju olivat tekijöitä, jotka rajoittivat konsentraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa.

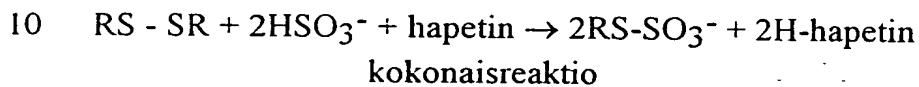
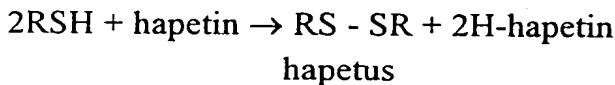
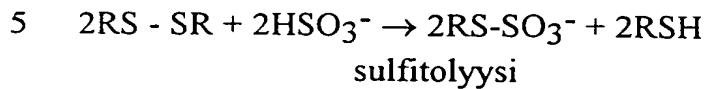
25 Heraproteiini-isolaattien hyviä ominaisuuksia ja käyttökelpoisuutta rajoittaa valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkeahko hinta.

30 Muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla voidaan vaikuttaa molekyylin varaukseen, avaruusrakenteeseen ja siten eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja osittain emulgointiominaisuuksiin.

35 Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin rakenteen muuntelussa on sulfonointi, so. oksidatiivinen sulfitolyyysi (sulfitolyyysi + hapetus). Siinä proteiinien aminohappoketujen väiset rikkisillat eli disulfididisokset aukaistaan, kun sulfiitti-ioneja lisäämällä käynnistetään hapetuspelkistysreaktio, jossa toinen rikki hapettuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi.

Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä vapaat sulfhydryyliryhmät hapettuvat jälleen disulfidisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes kaikki sulf-

hydryyliryhmät ovat sulfonioituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muodostunut rajoittavaksi. Sulfonioinnin eli oksidatiivisen sulfitolyysin periaate on kuvattu seuraavassa kaaviossa:



15 Siinä RS - SR kuvaaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketusta R, jolloin S - S on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfidisidos, joka yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon, joka laukeaa reaktion myötä. Muunnetut proteiinimolekyylit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyysireaktion pH:sta pH 3-5:een.

Oksidatiivista sulfitolyysiä on julkaisussa Kella, N.K.D., *et al.*, *J. Agr. Food Chem.*, **37** (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyylien muunteluun tarkoituksena vaikuttaa proteiinien funktioaalisiin ominaisuuksiin kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahdon pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vaikuttavana tekijänä oli disulfidisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disulfidisidosten kokonaismääärään. Tietyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfidisidosten vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfidisidoksista kadottua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui seuraavasti; disulfidisidosten poistuma %:eina sekä vastaava liukoisuusminimi pH-astei-kolla: 25 % - pH 4,75; 50 % - pH 4,38; 75 % - pH 4,2; ja 100 % - pH 4,0.

30 Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25°C. Hapettavana tekijänä käytettiin liuoksen läpi puhallettua happea ja katalysaattorina CuSO₄:a liuotettuna 800 mM konsentraatiossa. Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammoniumsulfaatilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50-%:isesti kyllästetty. Muuttuneita liukoisuusominaisuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämisessä.

Julkaisussa Gonzalez, J.M., Damodaran, S., *J. Food Sci.*, **55** (1990) no 6, 1559-1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyysiä tarkoituksena eristää sellaisen makean raakaheran

proteiineja, jonka proteiinipitoisuus on noin 0,6 %, lähes samoissa koe-olosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25°C sekä hapettimena happi ja katalysaattorina Cu⁺⁺-ioni CuCO₃:na, mutta tässä tapauksessa kiinteinä helminä ja pakattuna lasikoloniin. Sulfitolyysin tuote hapetettiin sulfonaattijohdannaiseksi 5 kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa. Sen jälkeen helmijäännökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifugoimalla. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin funktioalaisina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuoksesta jouduttiin kuitenkin poistamaan sulfonoituun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä. Tässäkin oli kysymyksessä työläs ja 10 monimutkainen laboratoriomitau toteutus kalliilla laitteistolla ja kemikaaleilla, kuten edellisessä artikkelissa. Korotetun lämpötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta ei voida hyödyntää, sillä lämpötilan noustessa hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus (reagoiva määrä) alenee. Suolatkin alentavat liuoksen happipitoisuutta.

15 Heran proteiinien eristämistä toimivina tuotteina taloudellisesti on pyritty toteuttamaan jo kauan käyttämällä hyväksi monenlaisia menetelmiä, mutta esitetty ratkaisut ovat olleet puutteellisia useastakin syystä.

20 Edellä esitettyt sovellutukset, jotka perustuivat oksidatiiviselle sulfitolyysille, eivät joko pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiseen, vaan ainoastaan tiettyjen ominaisuuksien muunteluun, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävissä tuotantomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen.

25 Keksinnön tarkoituksena on aikaansaada heran proteiinien eristämiseksi menetelmä ja laitteisto, joka on mahdollisimman taloudellinen ja yksinkertainen. Lisäksi halutaan toimiva ja taloudellinen menetelmä heran eri proteiinien erottamiseksi toisistaan, jolloin voidaan poistaa heran proteiineista esim. pikkulapsille allergiaa aiheuttavat proteiinit. Keksinnössä pyritään myös sellaiseen heran proteiinien eristämisen menetelmään, joka tuottaa mahdollisimman funktioalista eli emulgointikykyistä, geelinmuodostuskykyistä ja vaahdonmuodostuskykyistä proteiinia. Tavoitteena on vielä mahdollisimman terveellisen ja miellyttävän sekä ihmislavinnoksi kelpaavan heran proteiinien 30 valmistusmenetelmä.

35 Keksinnössä pyritään myös menetelmään, jolla proteiinin koostumus saadaan haluttuksi.

Nämä tavoitteet on nyt saavutettu uudella menetelmällä heran proteiinien eristämiseksi, joille pääasiassa on tunnusomaista se, mitä sanotaan patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

Keksinnössä on siis oivallettu, että pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinit voidaan eristää kaupallisesti käyttökelpoisella prosessilla, mikäli prosessi sisältää vaiheet, joissa

- a) suoritetaan heran esikäsittely, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,
- 5 b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely, jossa esikäsitely hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa oleellisesti ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat, ja
- c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka ai-10 nakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsitellystä herasta. Keksinnölle on nimenomaan tunnusomaista se, että esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely b) suoritetaan siten, että esikäsitely hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat.

15

Kun puhutaan vaiheen b) sulfonioinnista oleellisesti ilman katalysaattoria, tarkoitetaan nimenomaan ilman sellaista CuCO_3 :n tapaista katalysaattoria, joka muuttaa ja/tai myrkyttää heraproteiinit. Muita elintarvikekelpoisia sulfonointia edistäviä aineita voidaan kylläkin käyttää. Keksinnön mukainen prosessi voidaan suorittaa joko jatkuvatoimiseena tai panostyyppisenä. Prosessi on kuitenkin edullisesti panostyyppinen, jolloin vä-20 hintään kaksi vaiheista a), b) ja c) voidaan suorittaa peräkkäin käyttäen samaa astiaa ja/tai samoja käsittelylaitteita.

Keksinnön mukaisen menetelmän lähtöaineena käytetään juustontuotannosta saatavaa heraa. Kuten jo mainittiin, vaihe a) käsittää veden noin 75-95-%:isen poistamisen herasta. Tämä veden poistaminen voi tapahtua millä tahansa alalla tunnetulla operaatiolla, jolloin edullinen operaatio on ultrasuodatus, erityisesti käyttämällä 9 000 - 40 000 D:n ultrasuodatuskalvoa. Erityisen edullisella ultrasuodatuslaitteella suodatuskalvojen pidätyssarvo on noin 10 000 D. Ultrasuodatuksessa hera konsentroituu siten, että sen nestevolyymi sisältää 4-16 kertaa enemmän kuiva-ainetta kuin konsentroimaton hera.25

30

Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaihe a) käsittää sellaisen vesimäärän poistamisen, että esikäsitellyn heran proteiinipitoisuudeksi tulee noin 2-7 % (paino/tilavuus), edullisesti noin 4 % (paino/tilavuus). Vedenpoistossa ja edullisesti ultrasuodatuksessa muodostunut suodos voidaan ottaa talteen ja se on prosessissa syntyvä käyttökelpoinen sivutuote.

35

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan heran esikäsittelyvaihe a) käsittää myös heran mikrosuodatuksen, joka edullisesti tapahtuu ennen veden noin 75-95-%:ista poistamista siitä. Mikrosuodatuksessa poistetaan herasta sinne jääneet maidon

1 kaseiinihiukkaset ja osa lipoproteiineista sekä vähennetään huomattavasti heran sisältämää bakteerimäärää tai poistetaan bakteerit kokonaan. Mikrosuodatus ei pidätä heran oleellisia proteiineja ja se suoritetaan käyttämällä 0,22-0,80 $\mu\text{m:n}$, edullisesti noin 0,22 $\mu\text{m:n}$ kalvoja. Mikrosuodatuksen ansiosta ultrasuodatus helpottuu ja nopeutuu ja 5 heran laatu paranee. Mikrosuodatettaessa heraa muodostuu pidätteenä sivutuotetta, joka on yksinkertaisimmillaan sopivaa rehukäytöön lämpökäsittelyn jälkeen. Mikrosuodatuksen lipoproteiinit ovat myös käyttökelpoisia luonnollisina emulgointiaineina elintarvikkeissa.

10 Heran esikäsittelyvaiheen a) jälkeen suoritetaan vaiheessa b) proteiinien sulfonointi, joka käsittää esikäsitellyn heran saattamiseen kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa. Kuten jo mainittiin, esikäsitely hera on konsentroitu ja edullisesti mikrosuodatettu. Sulfonoinnin toinen reagenssi eli sulfiitti voi olla mikä tahansa kemian alalla tunnettu sulfiitti tai sulfiitti-iona muodostava reagenssi. Erään suoritusmuodon mukaan sulfiittina käytetään tavallista sulfiittia, vety sulfiittia 15 ja/tai metabisulfiittia. Tällöin ko. suolojen kationisena komponenttina voidaan käyttää mitä tahansa suolan kationia, kuten ammoniumia, tai jaksollisen järjestelmän jonkin ryhmistä 1-4 metallia, kuten alkalimetallia tai maa-alkalimetallia. On edullista käyttää sulfiittina alkalimetallin ja/tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vety sulfiittia ja/tai metabisulfiittia, edullisesti natriumsulfiittia, natriumvety sulfiittia ja/tai natriummetabisulfiittia. 20 Erityisen hyviä tuloksia saadaan, mikäli eo. keksinnön mukaisen menetelmän vaiheessa b) käytetään sulfiittina natriumvety sulfiittia.

25 Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan valmistusprosessin sulfitolyyssä määrittämällä sulfiitin määräni suhde heraproteiinissa olevien disulfididisidosten määrään. Tyypillinen tapa laskea heraproteiinin sulfonointiin tarvittava sulfiittimäärä löytyy em. julkaisusta Gonzalez, J.M. ja Damodaran, S., J. Food Sci. 55 (1990), 1559-1563, jonka esitys liitetään tähän viitteeksi. Erään suoritusmuodon mukaan vaiheen b) sulfonoinnissa sulfiitin pitoisuus herakonsentraatissa on välillä noin 0,02-0,20 M, edullisesti välillä noin 0,05-0,10 M.

30 Menetelmän vaiheessa b) sulfonoinnin hapettimena käytetään keksinnön mukaisesti elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä (siis ei happikaasua), joka reagoi spontaanisti ja suoraan heraproteiinien sulphydryyliryhmien (-SH) kanssa muodostaen disulfidiryhmiä, disulfididisidoksia. Keksinnölle on oleellista, että elintarvilaatuinen hapettava yhdiste on niin reaktiivinen, ettei sulfonointireaktiossa tarvita katalyyttiä. Katalyytin käyttöön liittyy nimittäin se vaikeus, että se kontaminoi heran proteiinit ja on hyvin vaikea poistaa tuotteesta.

Elintarvikekelpoisia hapettimia tunnetaan alalla paljonkin, mm. elintarvikkeiden ja niiden puolivalmisteiden valkaisusta, kypsentämisestä ja ns. vettämisestä. Kirjallisuus mainitsee mm. erilaiset entsyymit, kuten aspergillus-flavus-oryzae-entsyymi, orgaaniset peroksidit, kuten asetoniperoksi ja bentsoyylicheroksi, epäorgaaniset peroksidit ja peroksisuolat, kuten ammoniumperoksisulfaatti, kaliumperoksisulfaatti ja kalsiumperoksi, myrkyttömät atsoyhdisteet, kuten atsodikarbonamidi (ADA), nitrosyylikloridi, L-kysteini, halogenaatit, kuten kaliumbromaatti, bromaatien ja jodaattien seokset, sekä kalsium- ja kaliumjodaatti. Myös yhdisteitä, kuten kalsiumstearoyyli-2-laktylaatti, klooria ja askorbiinihappoa on käytetty elintarvikekelpoisina hapettimina. On edullista, mikäli eo. keksinnön proteiinien sulfonointivaiheessa b) käytetään elintarvikelaatusena hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia CaO_2 ja/tai kaliumbromaattia KBrO_3 .

Elintarvikelaatusen hapettavan yhdisteen pitoisuus proteiinien sulfonointivaiheessa b) voi suurestikin vaihdella, riippuen toivottavasta sulfonointiasteesta. Eristettävien heraproteiinien halutut ominaisuudet taas määritetään, mihin sulfonointiasteeseen on pyrittävä. Lisäksi sulfonointiaste vaikuttaa heraproteiinien eristysmenetelmään, kuten mikrosuodatuksen, ultrasuodatuksen ja saostusolosuhteisiin. Siten voidaan sanoa, että keksintö koskee mitä erilaisimpien elintarvikelaatusen hapettavan yhdisten pitoisuksien käyttöä proteiinien sulfonointivaiheessa b). Erään suoritusmuodon mukaan on kuitenkin edullista käyttää sellaista elintarvikelaatusen hapettavan yhdisten pitoisuutta, joka on välillä noin 0,01-0,15 % (paino/tilavuus), laskettuna aktiivisena happena.

Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva reaktiolämpötila, saostuksessa käytetty pH sekä pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja emäkset sekä sopivat toimenpiteet haluttujen ominaisuuksien saamiseksi tuotteelle, joka voi olla heraproteiinin tai sen spesifisen fraktion konsentraatti, tahna tai jauhe.

Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaiheen b) sulfonointilämpötila on noin $25-55^\circ\text{C}$, edullisimmin noin $30-50^\circ\text{C}$. Edullinen pH, jossa sulfitolyyysi ja hapetus tapahtuu, on välillä noin 5,0-8,5. pH voidaan säätää myrkyttömillä hapoilla ja emäksillä, esim. lisääimällä suolahappoa HCl ja natriumhydroksidia NaOH tarpeen mukaan vaiheen b) sulfonointiseokseen.

Kuten edellä esitettiin, vaiheen b) sulfonointi koostuu itse asiassa kahdesta reaktiosta, sulfitolyyristä ja hapetuksesta. Nämä reaktiot voidaan joko suorittaa samanai-

kaisesti tai peräkkäin. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaiheen b) sulfonyointi eli sulfitolyysi ja hapetus suoritetaan kahdessa alivaiheessa siten, että b₁) heran proteiinit sulfitolysoidaan saattamalla esikäsitely hera kosketukseen sulfiitin kanssa ja b₂) sulfitolysoitut proteiinit hapetetaan saattamalla ne kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa. Tällöin on edullista käyttää muuten samoja parametrejä kuin edellä on esitetty sulfonointivaiheen b) käsittelyn yhteydessä, paitsi että alivaihe b₁) suoritetaan pH:ssa noin 6,0-7,5 ja edullisimmin pH:ssa 6,5-7,0. Edullinen reaktioaika on noin 10-50 minuuttia. Alivaihe b₂) suoritetaan edullisesti pH:ssa noin 5,0-7,0 eli hieman alempana kuin alivaihe b₁) ja edullisimmin pH:ssa noin 5,5-6,5. Reaktioaika on edullisesti noin 15-60 minuuttia eli hieman pitempi kuin vaiheessa b₁). Molempien vaiheiden b₁) ja b₂) edullinen lämpötila on noin 25-55°C, edullisimmin noin 30-50°C.

Kun esillä olevan keksinnön mukaisen prosessin vaiheen b) proteiinien sulfonointi on suoritettu loppuun, saadaan tuloksena seos, joka muodostuu oleellisesti laktoosista ja sulfonoiduista proteiineista vesiliuoksenä, sulfonioitu herakonsentraatti. Tälle liuokselle suoritetaan loppukäsittely vaiheessa c), jossa sulfonoidut proteiinit erottetaan siitä ja otetaan talteen. Erotus ja talteenotto voi tapahtua pääasiassa kolmen menetelmän mukaisesti: konsentroimalla sulfonoidut proteiinit, saostamalla ne tai suorittamalla niille fraktointisaostus. On tietenkin selvää, että nämä kolme päämenetelmää voidaan modifioida ja yhdistää esim. siten, että saostus suoritetaan vain rajoitetulle fraktiomääärälle ja loput fraktiot konsentroidaan, jne. On myös selvää, että keksinnön mukaiseen menetelmään kuuluu olemassa olevien operaatiomahdollisuuksien ja laitteiden käytön vaihtelu siten, että tarvittaessa vaihdellaan em. vaiheen c) erotus- ja talteenotto-operaatioita.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan prosessin sulfonioitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsittää sulfonioitujen proteiinien erottamisen käsittelystä herastalisäkonsentroimalla, jolloin saadaan talteen oleellisesti kaikki sulfonoidut proteiinit yhdessä käsittävä tuote, kokonaisproteiinituote. Tämä vaihtoehto johtaa pikemmin edulliset funktionaaliset ominaisuudet omaavaan proteiiniseokseen kuin toisistaan erotettuihin puhaisiin proteiineihin. Prosessivaihtoehdon mukaan proteiineja ei tarvitse vaiheessa b) sulfonoida saostusta silmälläpitäen, vaan funktionaalisia ominaisuuksia, kuten vahtoavuutta, vaahdon pysyvyyttä, viskositeettia, liukoisuutta, emulgointikykyä ja geeliytyvyyttä silmälläpitäen. Kuten hakemuksen johdannosta ilmeni, sulfonoidut proteiinit saostuvat happamassa pH:ssa. Silloin, kun sulfonioitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsittää niiden konsentroinnin ilman saostusta, sulfoniryhmät jäävät rakenteeseen parantaen em. funktionaalisia ominaisuuksia.

On edullista, mikäli vaiheen c) sulfonioitujen proteiinien konsentrointi ja pesu tapahtuu ultrasuodattamalla. Tällöin voidaan käyttää ultrasuodatinta, jonka suodatuskalvojen pidätyssarvo on välillä 9 000 - 40 000 D, edullisesti noin 10 000 D. On edullista konsentroida proteiineja mahdollisimman paljon, vähintään 10 paino-%:iin, 5 mikä onnistuu helposti, kun laktoosi ja sulfonioinnissa muodostuneet suolat pestään pois tai niitä vähennetään oleellisesti. Tässä yhteydessä säädetään pH haluttuun arvoon.

Konsentrointi tapahtuu edullisesti pH:ssa 6-8, mikä on luonnollista, sillä alemmassa pH:ssa sulfonoidut proteiinit saattavat saostua, eivätkä ole enää konsentroitavissa 10 liuksena. Edullisin konsentrointi-pH on 6,5-7,5. Konsentraatin pesu lisäämällä konsentraattiin vettä tietty määrä ja suodattamalla se sen jälkeen pois tapahtuu ennen proteiinien lopullista konsentrointia.

Ultrasuodatus voidaan suorittaa esimerkiksi siten, että sulfonioitu herakonsentraatti siirretään konsentrointisäiliöön, suodossäiliöön, jossa se pestään ja konsentroidaan 15 kierrättämällä konsentraattia ultrasuodatuslaitteessa. Tarpeellisen konsentroinnin jälkeen mahdollisesti pH-vakioitu ja pesty konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata proteiinijauheksi. Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos otetaan talteen ja se voidaan käyttää mm. maitohapon fermentointiin.

Ultrasuodatus tapahtuu esim. siten, että sulfonioitujen proteiinien vesiliuos siirretään 20 konsentrointisäiliöön, jossa se konsentroidaan kierrättämällä liuos ultrasuodatinlaitteessa. Tarpeellisen konsentroinnin jälkeen mahdollisesti pesty ja pH-vakioitu konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata valmiaksi proteiinijauheksi. Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos voidaan ottaa talteen ja käsittää tai jalostaa edelleen.

25 Erään suoritusmuodon mukaan vaihe c) käsittää vesilioksessa olevien sulfonioitujen proteiinien puhdistamisen mikrosuodatuksella, joka edullisesti tapahtuu ennen maanmittua konsentrointia. Mikrosuodatus tapahtuu edullisesti laitteella, jossa käytetään 0,22 µm:n kalvoja, joilla sulfonioitujen proteiinien liuoksesta poistetaan sulfonointivaiheessa b) siihen muodostuneet liikenemattomat epäpuhtaudet.

30 Kuten edellä mainittiin, sulfonioitujen proteiinien konsentraattia voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata jauheksi. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan vaihe c) käsittää konsentraatin proteiinien hydrolysoinnin pienimolekyyliksi peptideiksi. Pienentämällä proteiinien molekyylikokoa voidaan jossain määrin vähentää proteiinien allergeenisia ominaisuuksia. Myös proteiinien toiminnallisia ominaisuuksia

voidaan tietyissä määrin muunnella molekyylikokoa pienentämällä. Mainittu hydrolysointi tapahtuu edullisesti entsymaattisesti, jolloin syntyy kokoheraaproteiinihydrolysaattia. Entsymaattinen hydrolyysi tapahtuu edullisesti membraanireaktorissa, jossa entsyymit hajottavat proteiinia halutun kokoisiksi peptideiksi ennen mainittua 5 kuivausta tai käyttöä sellaisenaan.

Keksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) sulfonioitujen proteiinien loppukäsittely käsittää edullisesti konsentroimalla erotettujen sulfonioitujen proteiinien tai niiden hydrolysoinnista syntyvän kokoheraaproteiinihydrolysaatin kuivaamisen kiinteäksi jauheeksi. Konsentroinnista saatava suodos voidaan haluttaessa johtaa rikkidioksidin 10 poistoon, joka tapahtuu alentamalla pH, edullisesti arvoon ≤ 5 , ja lämmittämällä, edullisesti lämpötilaan noin 30-50°C. Tällöin suodoksessa oleva sulfiitti muuttuu rikkidioksidiksi/rikkihapokkeeksi, joka poistetaan puhaltamalla inertillä ja steriilillä 15 kaasulla. Rikkihapoke neutraloidaan edullisesti prosessissa käyttökelpoiseksi sulfittiksi, kuten natriumvetysulfittiksi. Neutralointiin voidaan käyttää natriumhydroksidia NaOH.

Edellä on käsitelty sulfonioitujen proteiinien loppukäsittelyvaihetta c), joka käsittää mainittujen sulfonioitujen proteiinien erottamisen konsentroimalla ja mahdollisesti kuivaamalla. Toinen käyttökelpoinen menetelmä sulfonioitujen proteiinien erottamiseksi on suorittaa niiden saostaminen happamassa pH:ssa. Tällöin syntyvä sakka sisältää ko. pH:ssa liukenevät proteiinit, kuten α -laktalbumiini ja naudanseerumialbumiini BSA:n sekä mm. immunoglobuliinit, laktoferriinin ja -peroksidaasin, ja jäävä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukenevat proteiinit, kuten β -laktoglobuliini. Saostuksen jälkeen sakka erotetaan vesifaasista. On edullista suorittaa proteiinien sulfonointivaihe b) ja sulfonioitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c), joka tässä 20 25 30 35 saostuksessa on saostaminen ja sakan erottaminen, peräkkäin käyttäen samaa astiaa.

Sulfonointivaiheen b) jälkeen sulfonoidut proteiinit saostetaan siis vaiheessa c) laskevalla pH riittävästi happamen puolelle. Saostuksessa käytetyt muuttujat ja niiden arvot ovat: saostus-pH on noin 2,5-6,5, edullisesti noin 3,0-5,0. Edullinen saostuslämpötila on noin 25-55°C, mielellään noin 30-50°C. Lisäksi on edullista erottaa sulfonoidut proteiinit siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 min aikana, proteiinien vaiheen b) pH-arvosta vaiheen c) sulfonioitujen proteiinien saostus-pH-arvoon, edullisesti viimeksi mainitun pH-arvon alarajaan. pH:n happamaksi säätämisen jälkeen on edullista suorittaa saosteen sekoitus noin 10-60 min ajan. Saostus-pH aiakaansaadaan myrkyttömällä ja edullisesti epäorgaanisella hapolla. Erityisen edullinen epäorgaaninen hoppo on HCl. Mikäli pH-arvo halutaan nostaa, se tapahtuu

edullisesti myrkyttömällä epäorgaanisella emäksellä, kuten sodiumhydroksidilla NaOH. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan proteiinien sulfonointivaihe b) ja sitä seuraava sulfonointujen proteiinien loppukäsittelyvaiheen c) saostus suoritetaan vuorotellen vähintään kahdessa rinnakkain kytketyssä astiassa. Tämä tapahtuu edullisesti siten, että vaihe b) ja vaihe c) tehdään kahdessa astiassa vuorotellen tai siten, että vaiheiden b) ja c) täyttö-, tyhjennys- ja erottusoperaatiot vuorottelevat vaiheiden pääoperaatioiden (sulfonointi, saostus) kanssa tai siten, että erottusoperaatio vuorottelee em. pääoperaatioiden muodostaman peräkkäiskokonaisuuden kanssa. Siten voidaan laitteistoa käyttää mahdollisimman tehokkaasti hyväksi vuoroperaatteella.

10

Keksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) saostuksen jälkeen syntynyt sakka erotetaan vesifaasista. Tämä erottus voi tietenkin tapahtua millä tahansa biokemiallisen laitetekniikan tuntemalla tavalla. Tyyppillisiä sakan erottamismenetelmiä ovat separointi ja/tai mikrosuodatus. Erään suoritusmuodon mukaan vaihe c) käsittää happamassa pH:ssa olevan saosteen (sakka + vesifaasi) konsentroinnin mikrosuodattamalla, edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, jolloin ainakin osa vesifaasista erottuu sakasta. On edullista, mikäli maiittu toinen menetelmä on separaattorierotus ja edullisimmin sentrifugiseparaattorierotus. Sakka, saostuma, on siis hyvä eristää saosteesta separaattorilla ja edullisesti ensin mikrosuodattamalla ja sitten separaattorilla, kun eristetään proteiini halutaan tahnana.

Kun vaiheen c) sakka on eristetty saosteesta, se voidaan jatkojalostaa monella tavalla. Erään suoritusmuodon mukaan sakka voidaan pestää lisäämällä siihen pesuvettä ja konsentroimalla se uudestaan esim. käyttämällä separaattoria. Eristetty ja mahdollisesti pesty sakka voidaan konsentroida proteiinitahnaaksi, edullisesti käyttämällä sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta. Valinnaisesti proteiinitahnaa voidaan sekoittaa ja/tai sen pH:ta säätää, edullisesti arvoon 6-8, emäksellä tai emässeoksella. Proteiinitahnan neutralointi tällä tavalla tapahtuu edullisesti myrkyttömällä emäksellä tai emässeoksella, joka edullisesti on epäorgaaninen emäs. Soivia emäksiä ovat sodiumhydroksidi NaOH, sodiumhydroksidin NaOH, kalsiumhydroksidin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ja kaliumhydroksidin KOH seos, jolloin kalsiumhydroksidin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen kalsiumin Ca määrän.

35

Kun eksinnön mukaisen prosessin vaihe c) suoritetaan erottamalla proteiinit saostamalla, saostuksesta jää sakan lisäksi vesifaasi eli suodos. Kuten edellä mainittiin, tämä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukoisia proteiineja, kuten β -laktoglobuliinia.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan nämä vesifaasin sisältämät liukoiset proteiinitkin otetaan talteen. Talteenotto voidaan suorittaa ultrasuodattamalla, mikä tapahtuu oleellisesti samalla tavalla kuin edellä on esitetty prosessivaiheen c) koko-naisproteiinikonsentrointivaihtoehdon yhteydessä. Liukoiselle proteiinifraktiolle voidaan tämän mukaan suorittaa myös jatkokäsittelyjä, kuten konsentrointi, pH:n säätö, pesu, hydrolyysi ja/tai kuivaus.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien eristäminen tapahtuu seuraavina jaksoina: heran konsentrointi ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen sulfonioinnin avulla, saostaminen laskemalla pH:ta, saostuneiden proteiinien konsentrointi ja pesu mikrosuodattamalla, niiden erottaminen sentrifugoimalla tai suodattamalla tai suihkekuivauksella ja saostumattomien proteiinien konsentrointi ja pesu ultrasuodattamalla sekä erottaminen suihkekuivauksella.

Edellä on käsitelty eksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) ne sulfonioitujen proteiinien erotus- ja talteenottovaihtoehdot, joissa proteiinit on eristetty konsentroimalla tai saostamalla. Keksinnössä on nyt havaittu, että esillä olevan eksinnön mukainen prosessi, jossa proteiinia sulfonoidaan suoraan sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapetavan yhdisteen kanssa, soveltuu mainosti heran proteiinien eristämiseen fraktiosaostuksen avulla. Fraktiosaostus merkitsee sitä, että heran proteiinit, paitsi että ne ovat erotettavissa käsitellystä herasta, myös ovat erotettavissa toisistaan niin, että ne saadaan talteen omina fraktioinaan.

Heran sulfonoidut proteiinit ovat jaoteltavissa useampaan osaan kuin vain kahteen: saostuvaan ja liukoiseen osaan. Vaihtelemalla sulfonointiastetta ja saostus-pH:ta voidaan sulfonoidut proteiinit saostaa useana eri osana, jolloin saostumien ja liukosien osan proteiinikostumus on määriteltävissä suhteellisen tarkasti. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan sulfonioitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsitteää sulfonioitujen proteiinien erottamisen käsitellystä herasta ja toisistaan fraktiosaostamalla useassa happamassa pH:ssa, jolloin ensimmäisessä saostuksessa ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvä sakka, joka sisältää ko. pH:ssa liukenemattomat proteiinit, erotetaan ja otetaan talteen, ja ko. pH:ssa syntyvälle vesifaasille, suodokselle, joka puolestaan sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit, suoritetaan toinen saostus toisessa happamassa pH:ssa jne., kunnes saadaan kutakin hapanta saostus-pH:ta vastaavat sakat, joissa on vastaavat proteiinit, ja kaikkien saostuksien jälkeen jäävä vesifaasi, jossa on kaikissa saostus-pH:issa liukoisena säilyneet proteiinit.

Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaihe c) käsittää sulfonointujen proteiinien erottamisen fraktiosaaostamalla kahdessa tai kolmessa happamassa, edullisesti alenevassa pH:ssa, edullisesti pH:ssa noin 5,0, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä α -laktalbumiinista, pH:ssa noin 4,5, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä naudanseerumialbumiinista (BSA), ja pH:ssa noin 4,0, jolloin saostuvat esim. loput naudanseerumialbumiinista ja em. muut happamassa saostuvat proteiinit, mainitussa järjestyksessä, jolloin jäljelle jää vesifaasi, jossa on ko. kolmessa saostus-pH:ssa liukoisena säilyneet proteiinit, esim. β -laktoglobuliini. Tällöin ensimmäisestä saostuksesta ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvän sakan eroitus tapahtuu joko sentrifugoimalla ja/tai mikrosuodattamalla tai muulla alalla tunnella sakan erottamismenetelmällä, jolloin ko. pH:ssa jäävälle vesifaasille tai vesifaasin konsentraatille suoritetaan toinen saostus jne., kunnes eri pH:ssa saostetut proteiinit saadaan oleellisesti kiinteinä erikseen talteen ja liukenevat proteiinit voidaan edullisesti eristää konsentroimalla ja kuivaamalla viimeisestä saostuksesta jäänyt vesifaasi. Keksinnön mukaisella menetelmällä on mm. se etu, että sulfonointujen proteiinien loppukäsittely, kuten esim. mikrosuodatus ja/tai ultrasuodatus, voidaan suorittaa vaiheen a) heran vastaavan typpisillä tai vastaavilla esikäsittelylaitteilla.

Vaiheen c) fraktiosaaostuksen muut parametrit voivat esim. olla samanlaiset kuin normaalissa saostuksessa eli usean, edullisesti alenevan pH:n lisäksi sulfonoidut proteiinit voidaan erottaa saostamalla lämpötilassa 25-55°C, edullisesti lämpötilassa 30-50°C, siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 min aikana, proteiinien edellisen saostuksen pH-arvosta seuraavan saostuksen pH-arvoon ja suorittamalla saosteen sekoitus uuden pH:n happamaksi säätämisen jälkeen noin 10-60 min ajan.

Samoin happamassa pH:ssa olevan saosteen (sakka + vesifaasi) konsentrointi voidaan suorittaa mikrosuodattamalla ja edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, kuten sentrifugiseparoinnilla, hihna-suodattamalla tai rumpusuodattamalla. Fraktiosaaostuksessa on erityisen edullista käyttää vähintään kahta rinnakkain kytkettyä saostusastiaa, jotta peräkkäin suoritettavia saostuksia voitaisiin nopeuttaa.

Fraktiosaaostuksen yhteydessä voidaan myös erottaa happamassa pH:ssa vapautuva rikkidioksiidi/rikkihapoke ja ottaa se talteen, edullisesti johtamalla saostusseokseen steriloitua inerttiä kaasua, joka vie mukanaan rikkidioksidin/rikkihapokkeen säiliöön, jossa se mielellään neutraloidaan, mieluimmin NaOH:lla, prosessissa uudelleen käyttökelpoiseksi natriumvetyssulfiitiksi NaHSO_3 , joka puolestaan syötetään sulfittina takaisin sulfonointivaiheeseen b).

Kuten mainittiin, sakka voidaan eristää saosteesta tai sen pestystä konsentraatista separaattorilla, kuten sentrifugiseparaattorilla. Pesty konsepttä voidaan konsentroida proteiinitahaksi, edullisesti käyttäen sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta. Siinä tapauksessa, että saostumaa, sakkaa, ei ole erotettu

5 mikrosuodattamalla eikä pesty ja konsentroitu ultrasuodattamalla eikä pH:tä säädety, proteiinitahnaa joudutaan sekoittamaan ja sen pH säätämään esim. arvoon 6-8 emäksellä tai emässeoksella, joka edullisesti on NaOH, NaOH:n, Ca(OH)₂:n ja KOH:n seos, jolloin Ca(OH)₂:n määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen Ca:n määrän.

10 Kuten mainittiin, fraktiosaostuksen jälkeen suodos sisältää edelleen happamissa pH-arvoissa liukoisena säilyneet proteiinit, kuten β -laktoglobuliinin, joka edullisesti otetaan talteen esim. ultrasuodatuksella, jolloin se voidaan jatkokäsitellä, kuten konsentroida, pH-säätää, pestää, hydrolysoida ja/tai kuivata jauheeksi. Proteiinien fraktointi voidaan suorittaa vaihtelemalla vaiheen b) sulfonointiastetta ja/tai vaiheen c) saostus-pH:ta.

15

Seuraavassa on esitetty lähempä yleinen kuvaus keksinnön erään suoritusmuodon mukaisesta menetelmästä suoritusesimerkkeineen ja laitteistokuvauksista keksinnön neljän suoritusmuodon mukaisesta laitteistosta laiteselvityksineen ja viitauksineen 20 kuvien, joissa kuvat 1-4 esittävät keksinnön eräiden suoritusmuotojen mukaiset laitteistot heraproteiinien eristämiseksi.

25 Herakonsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen tapahtuu sulfonoinnin avulla, jolloin disulfidisidosten sulfhydryyliryhmät sekä vapaat sulfhydryyliryhmät sulfonydaan määrellisesti halutulle tasolle. Heraproteiinien sulfitolyyysi ja hapetus toteutetaan tässä suoritusmuodossa seuraavalla tavalla:

Herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus on esimerkiksi 4 %, otetaan tarvittava määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittaus ja säätö.

30 Konsentraatin lämpötilaksi säädetään 30-50°C, esim. 35-45°C. Lämpötilan valinta johtuu mm. halutusta reaktionopeudesta, käytetyistä kemikaaleista sekä eristettäville proteiineille halutuista funktioalaisista ja muista ominaisuuksista. Vakiolämpöiseen herakonsentraattiin lisätään sulfiittia joko NaHSO₃:na, Na₂S₂O₅:nä tai Na₂SO₃:na 35 0,02-0,2 M, esim. 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinikonsentraatiosta ja halutusta sulfitolyyysiasteesta.

pH säädetään välille 6,0-7,0, esim. 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia happoja ja emäksiä, kuten HCl:a ja NaOH:ta. Reaktioaika, jona sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 minuuttia, edullisesti 20-40 minuuttia. Aika määräytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun reaktiotasapainon saavuttamiseksi.

Tämän jälkeen lisätään reaktoriin hapetin. Hapettimena tulevat kyseeseen ne elintarvikelaatuiset hapettavat kemikaalit, joiden aktiivisuus on hallittavissa kyseissä olosuhteissa niin, että proteiinit saadaan tehokkaasti eristetyiksi ja niille saadaan halutut ominaisuudet sekä koostumus. Käyttökelpoisia kemikaaleja ovat mm. bromaatit, esim. $KBrO_3$ (aktiivisen hapen määrä 28,6 %), ja peroksidit, esim. CaO_2 (aktiivisen hapen määrä 22,2 %). Hapettimen määrä määräytyy hapetettavien sulfhydryyliryhmien sekä hapettimen aktiivisen hapen määrän mukaan, esim. CaO_2 :n määrä on 0,1-1,0 %, edullisesti 0,2-0,6 %, seoksen tilavuudesta (paino/tilavuus-%/herakonsentraatissa, jossa proteiinipitoisuus on 2-7 %).

Herakonsentraatin pH:ksi säädetään 5,0-7,0, esim. 5,5-6,5. pH:n valinta riippuu siitä, kuinka nopeaksi hapetusreaktio halutaan ja miten sen halutaan vaikuttavan lopputuotteen ominaisuuksiaan. Reaktiolämpötila voidaan pitää samana kuin sulfitolyyssä tai muuttaa edellä annettujen arvojen puitteissa reaktionopeuden säätelemiseksi.

Reaktioaika voi olla 15-60 minuuttia, edullisesti 30-45 minuuttia. Tänä aikana konsestraattia sekoitetaan tehokkaasti. Ajan pituudella voidaan vaikuttaa reaktion täydellisyteen ja aktiivisuuden kanssa proteiinien saantoon, koostumukseen ja ominaisuuksiin.

Oksidatiivisen sulfitolyyzin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli herakonsentraatin proteiinipitoisuudella, sulfiitin määrellä, reaktioseoksen eri vaiheissa käytetyillä pH:illa ja lämpötiloilla, hapettavan yhdisteen ominaisuuksilla ja määrellä sekä eri vaiheissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktoiden toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH hitaasti 3,5-5,5:een, edullisesti 4,0-5,0:aan. Saostuksessa käytettävä pH riippuu mm. oksidatiivisen sulfitolyyzin asteesta eli siitä, mikä osa olemassa olevista disulfidisidoksista ja vapaista sulfhydryyliryhmistä on sulfonoitu. Saostamiseen käytetty aika on 10-60 minuuttia,

esim. 20-40 minuuttia. Saostettujen proteiinien konsentointi ja pesu tapahtuu mikrosuodattamalla sekä erotus suodattamalla nauha- tai rumpusuodattimella tai sentrifugoimalla, jolloin tuotteena saadaan proteiinitahnaa.

5 Pesu on konsentroinnin yhteydessä tärkeää, koska siinä voidaan poistaa konsentraatissa oleva laktoosi sekä samalla muuntelussa ja saostuksessa lisätty ylimääräiset kemikaalit ja syntyneet suolat, jotka muutoin jäisivät proteiinivalmisteeseen.

Lopullinen tuote valmistetaan tahnasta nostamalla sen pH 6-8:aan lisäämällä

10 NaOH:ta ja Ca(OH)₂:ta tai NaOH:ta, KOH:ta ja Ca(OH)₂:ta sopivassa suhteessa. Kalsiumin lisääminen eristettyihin heraproteiineihin palauttaa niiden alkuperäisen kalsiumtasapainon sekä parantaa niiden geeliytymisominaisuuksia.

Saostekonsentraatti on käytettävissä sellaisenaan tai kuivattuna mm. suihkekuivaimella, jolloin tuote on proteiinijauhe. Kuivattavaksi tarkoitettu saostekonsentraatin

15 pesu, pH:n nosto 6-8:aan käyttämällä edellä mainittuja emäksiä ja lopullinen konsentointi tapahtuu ultrasuodattamalla ennen kuivausta. Saostetta konsentroitaessa mikrosuodattamalla syntynyt suodos konsentroidaan, sen pH säädetään kuten edellä ja pestään ultrasuodattamalla. Saatu konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai 20 kuivata proteiinijauheeksi. Proteiinien saostaminen saatetaan tehdä peräkkäin, alenevissa ja tarkasti määrätyissä pH:issa, jolloin saadaan eristetyksi tietty proteiinit esim. α -laktalbumiini ja naudan seerumialbumiini (BSA) (fraktiosaoostus). Muodostuneet saostumat, sakat, sekä suodokset ovat käsittelyissä kuten edellä on kuvattu kokonaissaostuksen yhteydessä.

25

Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä.

Esimerkki 1

Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynytä esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 0,60 % (proteiinityppi x 6,38) ja kokonaistypen (muutkin typpiyhdisteet) mukaan laskettu proteiinipitoisuus 0,80 %, mikrosuodatettiin 0,45 μ :n suodatinkalvolla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodosta konsentroitiin

30 ultrasuodattamalla samalla laitteistolla 10 000 D:n ultrasuodatuskalvojen läpi niin, että osa suodoksesta konsentroitiin 4 x:ksi ja osa 8 x:ksi eli konsentraattien lopputilavuudet olivat vastaavista alkutilavuuksista 25 % ja 12,5 %. Vastaavat proteiinipitoisuudet olivat 2,06 paino/tilavuus-% ja 4,01 paino/tilavuus-%. Eristämistä varten otettiin 4 x:stä herakonsentraattia 1,0 l 2 l:n lasiastiaan. Sitä pidettiin lämpötilaltaan 35 säädettävässä vesihautteessa ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella.

Konsentraatin lämpötila säädettiin 35°C:een. Sulfitolyysin käynnistämiseksi kon-
sentraattiin lisättiin 5,2 g NaHSO₃:a ja pH säädettiin 6,5:een lisäämällä NaOH:ta.
Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 minuuttia. Sen jälkeen seokseen lisättiin
KBrO₃:a 1,0 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusreaktio kesti 15 minuuttia.

5 Tämän jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,40:een lisäämällä seokseen
HCl. Saostumaa sekoitettiin vielä 30 minuuttia.

Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B -sentrifugissa 10 000 kierr./min
30 minuuttia. Saostetut proteiinit erottuivat hyvin. Proteiinit pestiin suspendoimalla
10 ne tislattuun veteen ja sentrifugoimalla uudelleen. Proteiinimassa oli helposti irtoa-
vaa ja lohkesi helposti palasiksi. Se varastoitin kannelliseen lasiastiaan ja pakastet-
tiin. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 3,0 g/100 ml herakonsentraattia.
Proteiinisaanto määritettiin sentrifugoimalla 20 ml:n saostemäärä + 10 ml tislattua
vettä 50 ml:n sentrifugiputkissa 30 minuuttia 10000 kierr./min. Sentrifugoinnin jäl-
15 keen kirkaste kaadettiin pois ja putkia pidettiin ylösalaisin vettä imevällä alustalla
noin 15 minuuttia irtoveden valuttamiseksi, minkä jälkeen ne punnittiin 5-10 mi-
nuutin sisällä. Rinnakkaimääritysten tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan. Näin
saadut tulokset korreloivat hyvin proteiinimääritysten kanssa, mutta olivat sitoutu-
neen vesimääärän verran suurempia. Määritykset olivat huomattavasti nopeampia ja
20 helpompia tehdä ja siksi niitä käytettiin saantojen määritysessä.

Esimerkki 2

1,0 l 8 x konsentroitua edellisessä esimerkissä mainittua herakonsentraattia, jonka
proteiinipitoisuus oli 4,01 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin tehokkaasti.

25 Siihen lisättiin NaHSO₃:a 10,40 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyysin reaktioaika
oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin KBrO₃:a 2,0 g. pH pidettiin
edelleen 6,5:ssä. Hapetuksen reaktioaika oli 15 minuuttia. Hapetusajan päätyttyä
proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Seosta sekoitettiin vielä 30 mi-
nuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi.

30 Proteiinit erotettiin ja pestiin sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Proteiinit olivat
helposti irtoavia ja lohkottavissa helposti palasiksi. Eristetty proteiinimassa pakas-
tettiin kannellisessa lasiastiassa myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määri-
tety proteiinisaanto oli 8,0 g/100 ml herakonsentraattia.

35

Esimerkki 3

Esimerkki 1:ssä selostetulla tavalla 4 x konsentroitua edam-juuston valmistuksessa
syntynyt ja sepaoritua esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 1,92 %, otettiin 1,0 l ja

lämmitettiin 35°C:een sekoittaen tehokkaasti. Konsentraattiin lisättiin NaHSO₃:a 5,2 g. pH säädettiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Sulfitolyysis-reaktion jälkeen seokseen lisättiin CaO₂:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa; aktiivisen hapen määrä noin 13,3 %) 2,2 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Ha-

5 petusaika oli 15 minuuttia, jona aikana seosta sekoitettiin tehokkaasti. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erottiin ja pestiin sekä varastoitiin kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa oli pehmeää, haurasta eikä helposti levitettävissä. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 1,75 g/100 ml herakonsentraattia.

10

Esimerkki 4

Esimerkki 3:ssa valmistetuista herakonsentraateista otettiin 1,0 l 8 x väkevöityä konsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli myös 4,01 %. Konsentraatti lämmitettiin 45°C:een ja sekoitettiin tehokkaasti. Siihen lisättiin 10,40 g NaHSO₃:a. pH säädettiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisät-

15 tiin CaO₂:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa) 4,3 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusaike oli 15 minuuttia. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erottiin ja pestiin sekä varastoitiin kuten esimerkissä 1. Proteiinimassa oli pehme-
20 ähköä ja haurasta eikä levityskelpoista. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,85 g/100 ml herakonsentraattia. Proteiinimassasta otettiin kaksi noin 10 g:n näytettä, joista toisen pH nostettiin noin 6,5:een lisäämällä 1,0 N NaOH:ta 0,4 ml:ja sekottamalla hyvin ja toiseen lisättiin 1,0 N NaOH:ta 0,25 ml ja 0,15 ml kyllästettyä Ca(OH)₂:ta. pH:n noston jälkeen ensimmäinen näyte oli pehmeää, levitettä-
25 väää, ei kokkareista eikä tarttuvaa. Toinen näyte oli edellistä vähän jäykempi mutta levitettävä, ei kokkareista eikä tarttuvaa.

Esimerkki 5

Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynytä esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 0,59 % mikro- ja ultrasuodatettiin samoilla laitteilla ja saman ohjelman mukaan kuin esimerkissä 1 8 x:ksi ja 16 x:ksi, jolloin niiden proteiinipitoisuudet olivat vastaavasti 3,92 % ja 7,00 %. 1,0 l 8 x konsentroitua herakonsentraattia proteiinipitoisuudeltaan 3,92 % lämmitettiin 45°C:iseksi ja sitä sekoitettiin jatkuvasti.

35

Siihen lisättiin Na₂S₂O₅:tä 9,50 g. pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Sulfitolyysis-reaktioaika oli 15 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin CaO₂:ta 4,30 g. pH säädettiin 5,5:een ja hapetuksen reaktioaika oli 30 minuuttia. Hapetuksen päätyttyä

seoksen pH laskettiin 4,0:aan HCl:lla proteiinien saostamiseksi. Saostumaa sekotettiin vielä 15 minuuttia. Saoste mikrosuodatettiin 0,45 μ :n kalvolla samalla Milliporen laboratoriolaitteella, jolla herakin käsiteltiin, ja konsentroitiin noin 2 x:ksi. Suodatus sujui nopeasti ja suodos oli kirkas, mikä osoitti, ettei saostuneita proteiineja tullut suodatuskalvon läpi. Konsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä. Konsentraatin pH nostettiin 6,5:een. Konsentraatin kuiva-aineepitoisuus ja tuhka oli noin 30 % alkuperäisestä pitoisuudesta, mikä oli tarkoituskin. Konsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä myöhempää käytöä varten. Suodoksesta tehtiin HPLC:llä määritys heran proteiinien määräsuhteiden säilymisestä saostamisen ja eristämisen jälkeen. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 9,3 g/100 ml herakonsentraattia.

Esimerkki 6

1,0 l edellisessä esimerkissä mainittua 8 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 3,93 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin jatkuvasti. Siihen lisättiin $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$:tä 9,5 g ja pH säädettiin 6,5:een NaOH :lla. Sulfitolyysi kesti 15 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin seokseen hapettimena CaO_2 :ta 2,2 g ja pH säädettiin 5,5:een. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan HCl:lla. Seosta sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Saoste konsentroitiin mikrosuodatuksella 2 x:ksi ja pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä kuten edellisessä esimerkissä. Saostekonsentraatin pH nostettiin 6,6:een. Sen kuiva-aineepitoisuus aleni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Saostekonsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä. Mikrosuodatuksen suodosta konsentroitiin noin 2 x ultrasuodattamalla 10 000 D:n kalvolla Milliporen laboratoriolaitteella, kuten esimerkeissä käytettyjä herakonsentraatteja valmistettaessa. Suodoskonsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä, minkä jälkeen sen pH nostettiin 6,4:ään. Konsentraatin kuiva-aineepitoisuus pieneni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Konsentraatti kylmäkuivattiin säilytystä varten. Saosteen mikrosuodoksesta tehtiin HPLC:llä määritys heran proteiinien määräsuhteiden säilymisestä käsittelyn ja saostuksen jälkeen. Verrattaessa tuloksia edellisen esimerkin tuloksiin huomattiin proteiinien määräsuhteiden muuttuvan erilaisen käsittelyn tuloksena. Erilaisella käsittelyllä voidaan vaikuttaa proteiinisaantoihin ja myös vaikuttaa saosteen ja suodoksen proteiinien määräsuhteisiin. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,1 g/100 ml herakonsentraattia.

35

Esimerkki 7

1,0 l esimerkissä 5 mainittua 16 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 7,0 %, lämmitettiin 45°C:een samalla sekoittaen. Siihen lisättiin

Na_2SO_3 :a 12,6 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyyzin reaktioaika oli 15 minuuttia.

Tämän jälkeen seokseen lisättiin CaO_2 :ta 4,3 g. pH säädettiin 6,0:aan. Hapetusaika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi. Proteiinit erotettiin ja pestiin

5 sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa pakastettiin kannelli-sessa lasiastiassa myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määritetty proteiini-saanto oli 12,0 g/100 ml herakonsenraattia.

Esimerkki 8 Heraproteiinien erotus, fraktiointi

10 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynytä esiheraa, jonka koko-naistypen (muutkin typpiyhdisteet kuin proteiinit) mukaan laskettu proteiinipitoisuus oli 0,82, mikrosuodatettiin 0,22 μ :n suodatinkalvoilla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodosta konsentroitiin ultrasuodattamalla samalla laitteis-tolla 10 000 D:n ultrasuodatuskalvojen läpi 8 x:ksi eli konsenraatin lopputilavuus

15 oli vastaavasta alkutilavuudesta 12,5 %. Konsenraatin proteiinipitoisuus oli 4,04 paino/tilavuus-%.

Eristämistä ja fraktiointia varten otettiin herakonsenraattia 1,0 l 2 l:n lasiastiaan. Se pidettiin vakiolämpöisessä vesihanteessa ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla se-

20 koittimella. Konsenraatin lämpötila pidettiin 45°C:ssa. Sulfitolyyzin käynnistämiseksi konsenraattiin lisättiin $\text{SO}_3^{=}$:ta 0,05 M ja pH säädettiin 6,5:een lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin tehokkaasti ja reaktio sai jatkua 30 min. Sen jälkeen seokseen lisättiin CaO_2 :a (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa) 0,22 % (paino/tilavuus-%). pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusreaktion kestoaika oli 15 min. Hapetuksen jälkeen seoksesta otettiin 10 ml:n näyte proteiinien koostumus-määritykseen lähtökoostumuksen määrittämiseksi.

Ensimmäinen saostus tehtiin pH:ssa 5,0. pH:n lasku suoritettiin lisäämällä tarpeelli-n määrä HCl:ää. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 min. Saosteesta otettiin 150 ml:n

30 näyte-erä, josta tehtiin myöhemmin käsittelyt määritykset.

Toinen saostus tapahtui pH:ssa 4,5. Edellisen näytteen oton jälkeen jäljelle jääneen saosteen pH:ta laskettiin pH 4,5:een lisäämällä HCl:ää tarvittava määrä. pH:n laskun jälkeen saostumaa sekoitettiin vielä 15 min. Tämän jälkeen saosteesta otettiin 150 ml:n näyte-erä määritysten tekona varten.

Kolmas saostus tapahtui pH:ssa 4,0. Edellisen näytteen oton jälkeen jäljelle jääneen saosteen pH laskettiin pH 4,0:aan lisäämällä tarvittava määrä HCl:ää. Saosteen se-

koitusta jatkettiin vielä 15 min. Tämän jälkeen saosteesta otettiin 150 ml:n näyte-erä määritysten tekoa varten.

Jäljelle jänyt saoste noin 800 ml mikrosuodatettiin edellä mainitulla laitteella saostuman erottamiseksi. Suodosta konsentroitiin ultrasuodattamalla edellä mainitulla laitteella ja pestiin kaksi kertaa lisäämällä tislattua vettä konsentraattiin konsentraatin suuruinen määrä. Samalla pestävän konsentraatin pH säädettiin 6,0:aan HCl:llä. Lisätyn vesimäärän suuruinen määrä suodosta suodatettiin pois. Näin vähennettiin alkuperäisen suodoksen sisältämää laktoosin ja käsittelyssä muodostuneiden suolojen, NaCl ja CaCl₂, määrää. Lopuksi pesty ja pH-vakioitu konsentraatti kylmäkuvattiin jauheeksi.

Ensimmäisen, toisen ja kolmannen saostuksen saostenäytteestä (150 ml) määritettiin saostuman määrä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Ensimmäisen saostuksen proteiiniisaanto oli 7,0 g/100 ml, toisen 7,7 g/100 ml ja kolmannen 8,45 g/100 ml. Viimeisen saostuksen pH 4,0:ssa saosteen mikrosuodatuksen suodoksen proteiinin määrä konsentroinnin, pesun ja kylmäkuivauksen jälkeen oli 57,0 % kuiva-aineesta, mikä puolestaan oli 6,6 g kuiva-ainetta/100 ml konsentraattia.

20 Kolmesta saostenäytteestä (150 ml) otettiin 80 ml saostetta 200 ml:n centrifugiputkeen ja centrifugoitiin Sorvall RC-5B-sentrifugilla 10 000 k ierr./min 30 min saostuman erottamiseksi kirkasteesta. Kaikista kolmesta kirkasteesta otettiin näyte heran pääproteiinien, α -laktalbumiinin, BSA:n ja β -laktoglobuliinin määritystä varten. Määritksen tehtiin SDS-PAG-elektoforeesina Pharmacian Phast System -laitteella käyttäen 10-15 % gradientgeelilevyjä valmistajan suosittelein ajo-ohjein. Jokaisella geelilevyllä ajettiin mukana määritettävien proteiinien mallinäytteet. Ajetun elektroforeesilevyn tulosten mukaan herakonsentraatti ja vastaava sulfonoitu herakonsentraatti sisälsivät vastaavat proteiinivyöhykkeet etenemissuunnasta lähtöpiesteeseen päin lueteltuina α -laktalbumiini, mp 14 200; välittömästi sen jälkeen β -laktoglobuliini, mp 18 400 ja selvästi kauimpana BSA, mp 66 200. Lähellä BSA:ta, sen etenemissuunnan puolella oli yksi heikko vyöhyke ja vastakkaisella puolella kaksi lähellä toisiaan. Lähimpänä lähtöpistettä oli selvä vyöhyke, joka lienee ollut immunoglobuliineja, mp 160 000. Kirkasteiden proteiinimääritysissä saatiin seuraavat tulokset: Ensimmäisessä saostuksessa pH:ssa 5,0 poistui saostumana α -laktalbumiini. Muut proteiinit näyttivät olleen määräältään lähes ennallaan. Toisessa saostuksessa pH 4,5:ssä BSA ja sen läheisyydessä olleet vyöhykkeet poistuivat lähes kokonaan. β -globuliini näytti määräältään muuttumattomalta. Kolmannessa saostuksessa

pH:ssa 4,0 kaikki muut vyöhykkeet poistuivat paitsi β -laktoglobuliini. Se näytti olevan edelleen määrältään alkuperäisellä tasolla.

5 β -laktoglobuliini näytti pysyneen kokonaan liuenneena suodoksessa saostuksessa pH:ssa 4,0 saostuman poiston jälkeen. Se eristettiin konsentroinnin ja pesun jälkeen liuoksesta kylmäkuivaamalla, kuten edellä on jo todettu.

Esimerkki 9

10 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynytä esiheraa käsiteltiin sa- moin kuin esimerkissä 8, paitsi että konsentraatin proteiinipitoisuus oli 6,38 paino- /tilavuus-% ja vastaavasti lopputilavuus pienempi kuin 12,5 % alkutilavuuteen näh- den. Eristäminen ja fraktiointi tapahtuivat muuten samoin kuin esimerkissä 8, paitsi että $\text{SO}_3^=$:n määrä oli 0,1 M ja CaO_2 :n määrä 0,43 % (paino/tilavuus-%), josta oli seurausena suurempi sulfonoitumisaste.

15 20 Saostusten saostumien määrit ja liukoisien osan proteiinipitoisuus olivat määritysten mukaan seuraavat: ensimmäinen saostus 12,0 g/100 ml, toinen saostus 13,0 g/100 ml ja kolmas saostus 14,6 g/100 ml. Liukoisesta osasta eristetyn proteiinin määrä oli 64,5 % kuiva-aineesta, mikä puolestaan oli 11,4 g kuiva-ainetta/100 ml konsentraat- tia.

25 Kolmen saostenäytteen kirkasteista tehdyt heran pääkomponenttien määritykset SDS-PAG-elektroforeesilla toteutettiin kuten esimerkissä 8. Tulosten mukaan hera- konsentraatin ja sulfonoidun herakonsentraatin sisältämien proteiinien vastaavat vyöhykkeet olivat samanlaisia kuin esimerkissä 8.

30 Ensimmäisessä saostuksessa pH:ssa 5,0 poistui saostumana α -laktalbumiini. Muut proteiinit näyttivät olleen määrältään ennallaan. Toisessa saostuksessa pH:ssa 4,5 BSA ja sen läheisyydessä olevat proteiinit ovat huomattavasti vähentyneet, mutta niitä on vielä selvästi jäljellä. β -laktoglobuliini oli vielä kokonaan jäljellä. Kolman- nessa saostuksessa pH:ssa 4,0 kaikki muut vyöhykkeet, proteiinit, poistuivat paitsi β -laktoglobuliini. Sen määrä näytti olleen alkuperäisellä tasolla.

35 β -laktoglobuliini oli määrältään alkuperäisenä ja liuenneena suodoksessa saostuman poiston jälkeen saostuksessa pH:ssa 4,0. Se eristettiin konsentroinnin ja kahden pesun jälkeen konsentraatista, liuoksesta, kylmäkuivaamalla, kuten edellä on jo todet- tu.

Esimerkki 10 Sulfonointiasteen vaikutus heran proteiinien funktionaaliin ominaisuuksiin

Samaa separoidusta edam-juuston valmistuksessa syntyneestä esiherasta valmistetusta konsentraattia kuin esimerkissä 8, jonka proteiinipitoisuus oli 4,04 % (paino/tilavuus-%)

5 sulfonioitiin 1,0 l samalla tavoin kuin esimerkissä 8. Tästä käytetään jatkossa nimeä erä 1. Toinen 1,0 l:n erä samaa herakonsentraattia sulfonioitiin samoin kuin esimerkissä 9. Tästä käytetään jäljempänä nimeä erä 2.

Molemmat erät 1 ja 2 konsentroitiin edelleen ultrasuodattamalla ja pestiin kolme

10 kertaa omalla tilavuudellaan tislattua vettä. Pesun aikana ja pesun jälkeen konsentraatin pH pidettiin 6,5-7,0:ssa. Pesu tapahtui niin, että konsentraattiin lisättiin sama määrä tislattua vettä kuin konsentraatin tilavuus oli. Konsentraatin tilavuus kasvoi siis kaksinkertaiseksi. Ultrasuodatuksella suodatettiin lisättävä vesimäärä vastaava määrä suodosta konsentraatista pois, jolloin konsentraatin määrä oli taas alkuperäinen. Tällä tavalla vähennettiin konsentraatin laktoosin ja sulfonoinissa muodostuneiden suolojen määrää. Näin pystyttiin nostamaan myös konsentraatin proteiinipitoisuutta, kun ultrasuodatus helpottui.

15 Kylmäkuivauksen jälkeen pestyistä ja pH-vakioduista konsentraateista saadut jauheet olivat koostumukseltaan seuraavankaisia: erä 1, kuiva-aine 98,0 %, proteiini

20 77,8 % ja tuhka 5,0 % sekä erä 2, kuiva-aine 97,0 %, proteiini 77,0 % ja tuhka 6,2 %. Molempien erien proteiinijauheesta määritettiin funktionaalisena ominaisuutena vaahtoavuus ja vaahdon pysyvyys sekä geeliytyvyys sekä verrattiin tuloksia sulfonointiasteseen suhteessa. Määritykset tehtiin Maatalouden tutkimuskeskuksen

25 Elintarvikkeiden tutkimuslaitoksen käyttämillä menetelmillä.

Vaahtoavuus määritettiin 150 ml:sta 3-%:ista proteiinijauheliusosta.

Erä	Vaahdon tilavuus ml	Vaahtoavuus-%	Pysyvyys min
1	2000	1230	21
2	2300	1430	27

30 Tulosten mukaan sulfonointiasteen nousu lisäsi vaahtoavuutta sekä vaahdon pysyvyttä.

Geeliytyvyys määritettiin 10-%:isesta proteiinijauheliusoksesta kahdessa pH:ssa 6,50 ja 7,50.

Erä	pH	Geeliytyvyys	Väri
1	6,50	3,5	5
	7,50	3,5	5
2	6,50	4,0	5
	7,50	4,5	5

Tulosten mukaan sulfonointiasteen nousu paransi geeliytyvyyttä.

Geeliytyvyyden arvosteluasteikko:

5 5,0 Täydellinen geeli; kiinteä, joustava, leikattava ja pidättää hyvin vettä raken-teessa,
 3,0 Selvä geelirakenne, jonkin verran hauras tai geelistä irtoaa vettä,
 1,0 Geelimäistä rakennetta vielä nähtävissä,
 0 Liuos tai saostuma

10

Geelin väri:

5,0 Valkoinen tai harmaa
 3,0 Valkoisen ja täysin läpikuultavan välimuoto
 1,0 Läpikuultava

15 Menetelmän ydinprosessin suoritusmuoto

Eristysprosessin ydinosa on kuvattu kuvassa 1. Siinä juustonvalmistuksen sivutuot-teena syntynyt hera johdetaan heräsäiliöön 1. Prosessein tarvitsema hera otetaan säiliöstä ja siirretään reaktoriin 4. Heraa ultrasuodatetaan proteiinipitoisuuden konsent-roimiseksi 4-7 %:ksi eli 8-16-kertaiseksi ja vähintään 75 % heran vedestä poiste-taan. Suodatus tapahtuu ultrasuodatuslaitteella 6, jonka suodatuskalvojen pidätys-arvo on noin 10 000 D. Heraa suodatetaan niin kauan, kunnes tarvittava määrä halutun väkevyistä konsentraattia on reaktorissa. Ultrasuodatuksessa muodostunut suo-dos johdetaan suodossäiliöön 7. Suodos on prosessissa syntynä käyttökelpoinen si-vutuote.

20

25 Reaktorissa suoritetaan oksidatiivinen sulfitolyysi, jossa herakonsentraatin proteiinit sulfonoidaan halutunasteisesti. Sulfonointi voidaan toteuttaa kahtena reaktion. Sulfitolyysisä sulfiitin sulfiitti-ionit aiheuttavat disulfidiryhmässä hapetus-pelkistys-reaktion. Sen tuloksena toinen rikki hapettuu sulfonaattiryhmällä ja toinen rikki pel-kistyy sulphydryyliryhmäksi. Hapetus tapahtuu lisäämällä reaktioon hapettavaa ke-mikaalia esimerkiksi kalsiumperoksidia, jolloin sulphydryyliryhmät hapettuvat di-

30

sulfidiryhmiksi. Muodostuneet disulfidiryhmät jatkavat taas sulfiitti-ionien aiheutta-massa sulfitolyysisä niin kauan, kunnes jokin tekijä muodostuu rajoittavaksi.

Heraproteiinien oksidatiivisessa sulfitolyysisä käytetään seuraavia muuttuja ja nii-den arvoja: herakonsentraatin proteiinipitoisuus 2-7 %, reaktiolämpötila 30-45°C,

5 sulfiittipitoisuus 0,05-0,20 M, sulfitolyysin reaktio-pH 6,0-7,5, reaktioaika 10-60 min, hapettimen määrä 0,01-0,15 paino/tilavuus-% aktiivista happea, oksidaatio-pH 5,5-7,0, oksidaation reaktioaika 10-60 min.

Sulfonoinnissa tarvittavat reagenssit sulfiitti ja oksidantti, hapettava reagenssi, ovat saatavissa annosteltuina painon mukaan säiliöistä A ja B.

10 Sulfonoinnin jälkeen proteiinit saostetaan laskemalla pH-riittävästi happamen puolle. Saostuksessa käytetyt muuttujat ja niiden arvot ovat: saostus-pH 3,5-5,5 ja saostusaika 10-60 min.

pH:n säätelyyn tarvittava happo ja emäs ovat käytettävissä säiliöissä 4a ja 5a.

15 pH:n laskun jälkeen vapautuu ylimääräisesti sulfiitista sekä sulfonaattiryhmistäkin rikkidioksidia, joka puhalletaan inertillä ja steriloidulla kaasulla säiliöstä 8 säiliöön 9. SO₂:sta muodostunut rikkihapoke neutraloidaan NaOH:lla tavallisimmin NaHSO₃:ksi. Tarvittava NaOH otetaan säiliöstä 5a.

20 Tämän jälkeen saostuma siirretään säiliöön 10, jossa se konsentroidaan ja pestään sentrifugoimalla separaattorilla 14. Pesty konsentraatti johdetaan säiliöön 13, josta se separaattorilla edelleen konsentroidaan proteiinitahnaksi. Tahnaksi konsentrointi voi tapahtua vaihtoehtoisesti suodattamalla esimerkiksi hihna- tai rumpusuodattimella. Tahnaa sekoitetaan ja sen pH säädetään halutuksi sekoittimessa 15. Pesty, valmiiksi sekoitettu ja pH-vakioitu proteiinitahna säilytetään kylmävarastossa 16.

25 Prosessin alkuosaa, heran proteiinien konsentrointia ultrasuodatuksen avulla, voidaan käyttää halutun väkevyn heraproteiinikonsentraatin tuottamiseen käytettäväksi mm. kastikkeisiin, kiisseleihin ja tiettyihin hapanmaitotuotteisiin. Reaktoriin 4 ultrasuodatuslaitteella 6 konsentroitu proteiinikonsentraatti siirretään säiliöön 10 ja sieltä edelleen käyttöpaikalle.

30 Ydinprosessissa olevat uutuudet, joita aiemmin ei ole käytetty vastaavissa yhteyksissä ovat: herakonsentraatin proteiinipitoisuus 4-7 %; reaktiolämpötila 30-50°C; oksidatiivisen sulfitolyysin hapettimena on käytetty reagenssia mm. CaO₂; rikkidioksidin puhallus ja sen talteenotto, neutralointi ja uudelleenkäyttö; saostuman kon-

sentrointi ja pesu sentrifugoimalla separaattorilla sekä pestyn konsentraatin konsentrointi tahnaksi separaattorilla tai suodattamalla ja proteiinitahnan pH:n säätö ja sekoitus tasalaatuiseksi massaksi.

5 Lisäksi laitteiston yksinkertaisin proteiinien eristämisvaihtoehto on heran proteiinien konsentrointi haluttuun väkevyyteen ja sen käyttö sellaisenaan ilmenneisiin sovellustarpeisiin.

Ydinprosessin ensimmäinen laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Ydinprosessia voidaan monipuolistaa ja parantaa tekemällä seuraavat lisäykset: Kuva 2.

10 Prosessin alussa ennen ultrasuodatusta on edullista mikrosuodattaa hera 0,22 μm :n kalvoilla ultrasuodatuksen helpottamiseksi ja nopeuttamiseksi sekä heran laadun parantamiseksi. Mikrosuodatuksessa poistetaan herasta sinne jäneet kaseiinihiukkaset ja osa lipoproteiineista sekä vähennetään huomattavasti heran sisältämää bakteerimäärää tai poistetaan bakteerit kokonaan.

15 Mikrosuodatettaessa heraa säiliöstä 1 mikrosuodatinlaitteella 2 reaktoriin 4 muodostuu pidätteenä sivutuotetta säiliöön 3 edellä mainituista aineista, jotka ovat sopivia rehukäyttöön kuumennuksen jälkeen. Toisaalta lipoproteiinit ovat käyttökelpoisia luonnollisina emulgointiaineina jatkokäsiteltäviksi elintarvikekäyttöön.

20 Samanaikaisesti mikrosuodatuksen kanssa voidaan käynnistää ultrasuodatus ultrasuodatuslaitteella 6 heraproteiinien konsentroimiseksi. Sivutuotteena syntynyt lakktoosipitoinen ja proteiiniton suodos varastoidaan säiliöön 7. Suodos on hyvä raaka-aine mm. lakktoosin eristämiseen ja lakktoosin fermentoimiseen maitohapoksi tai etanoliksi.

25 Prosessin toimivuuden ja nopeuden kannalta on edullista lisätä prosessiin toinen reaktori 5. Suodatuksessa voidaan tehdä vuorotellen eli suodattaa toiseen sillä aikaa, kun toisessa sulfonoidaan ja saostetaan edellistä erää. Lisäreaktorin käytössä voidaan hyödyntää samoja jo olemassa olevia toimintoja kuin alkuperäisen reaktorin käytössä eli sulfonoinnissa tarvittavia reagensseja, reagenssisäiliötä A ja B, pH:n säädössä tarvittavia hoppoja ja emäksiä, säiliötä 4a ja 5a sekä rikkidioksidin puhalluksessa 30 tarvittavia kaasusäiliötä 8 sekä talteenottosäiliötä 9 lisälaitteineen.

Saosteen määrän lisääntyessä tarvitaan sen käsittelyyn tehokkaampia laitteita. Käsittely nopeutuu ja tehostuu huomattavasti, kun saostuman erotukseen käytetään mik-

rosuodatusta. Saostuma konsentroidaan ja pestää mikrosuodatinlaitteen 11 avulla säiliöön 10. Mikrosuodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 12. Loput pesuvesistä johdetaan viemäriin. Pesty konsentraatti siirretään säiliöstä 10 säiliöön 13. Sieltä se voidaan konsentroida separaattorilla tai suodattamalla hihna- tai rumpusuodattimella tahnaksi ja käsitellä edelleen kuten aiemmin on kuvattu.

5 Sulfonointiasteella ja saostus-pH:lla voidaan vaikuttaa proteiinien jakautumiseen saostuman ja liukoisien osan välille. Aina ei ole edullista saostaa mahdollisimman paljon proteiineista, vaan saattaa olla edullisempaa saostaan niistä vain tietty osa, koska näin saadaan koostumukseltaan halutunlaista proteiinia tiettyyn käyttötarkoitukseen. Tiettyjä proteiineja saostettaessa saattaa liukoiseen osaan jäädä vielä huomattava määrä käytökelpoisia proteiineja. Näiden eristämiseksi säiliöön 12 varastoitu mikrosuodatuksen suodos ultrasuodatetaan ultrasuodatinlaitteella 17. Saostummat proteiinit konsentroidaan, pH nostetaan haluttuun arvoon NaOH:lla säiliöstä 5a ja pestää. Pesussa konsentraatista vähennetään tai poistetaan kokonaan laktosi ja käsitellyssä muodostuneet suolat NaCl ja CaCl₂. Suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 18, josta niiden sisältämä laktosi on hyödynnettäväissä esimerkiksi käymisteitse. Loput pesuvedet johdetaan viemäriin. Pesty ja pH-vakioitu proteiinikonsentraatti johdetaan ultrasuodoskonsentraatin säiliöön 19. Sieltä se otetaan kuivattavaksi kuivaimeen 20. Kuivain voi olla suihke-, tyhjö- tai kylmäkuivain.

10 15 20

15 Saatu proteiinijauhe säilytetään proteiinijauhevarastossa 21.

Haluttaessa valmistaa saostekonsentraatista jauhetta konsentraatti siirretään saoste-konsentraatin säiliöstä 13 suodossäiliöön 12. Konsentraatin pH nostetaan haluttuun arvoon NaOH:lla säiliöstä 5a, ja konsentraatti pestää ultrasuodattamalla ultrasuodatinlaitteella 17. Tämän jälkeen konsentraatti siirretään säiliöön 19. Konsentraatin kuivaus tapahtuu samoin kuin edellä on kuvattu mikrosuodoskonsentraatin käsittelyn yhteydessä. Muodostunut proteiinijauhe säilytetään varastossa 21.

25 30

Haluttaessa konsentroitua heraa tiettyihin elintarvikkeisiin, kuten kastikkeisiin ja vanukkaisiin tai fermentoitaviin maitotuotteisiin, sen tuottaminen tapahtuu kuten edellä on kuvattu. Hera mikrosuodatetaan mikrosuodatuslaitteella 2 ensin ja mikrosuodatuksen suodos konsentroidaan ultrasuodattamalla ultrasuodatuslaitteella 6 haluttuun proteiini- tai kuiva-aineekonsentraatioon. Konsentroinnin jälkeen herakonsentraatti siirretään säiliöön 10 ja sieltä edelleen haluttuun käyttökohteeseen.

Toisinaan tarvitaan herakonsentraattia tai -jauhetta, josta on poistettu osittain tai kokonaan laktoosi ja suolat. Silloin säiliössä 10 oleva herakonsentraatti siirretään säiliöön 12 ja se pestää ultrasuodattamalla ultrasuodatuslaitteella 17 haluttuun puhatauteen ja konsentroidaan haluttuun proteiinipitoisuuteen. Näin saatu konsentraatti siirretään säiliöön 19. Sieltä konsentraatti voidaan kuljettaa sellaisenaan käyttöpakkale tai kuivata kuivaimessa 20.

Ydinprosessin ensimmäisessä laajennuksessa ja parannuksessa ilmenevät uutuudet, joita aikaisemmin ei ole käytetty samassa yhteydessä: heran mikrosuodatus ennen konsentrointia ultrasuodatuksella; kahden reaktorin käyttö sulfonoinnissa ja saostuksesta vuorotellen; saostuman erotus ja pesu mikrosuodattamalla; mikrosuodatuksen suodoksen konsentrointi; pH:n säätö ja pesu ultrasuodattamalla; konsentraatin kuvaus jauheeksi, edellisen toteutuksessa herakonsentraatin proteiinit jaettiin saostamalla kahteen osaan, joiden määrä ja koostumus on säädeltävissä sulfonointiasteella ja saostus-pH:lla; saostuman kuvaus jauheeksi tahnan valmistuksen sijaan ja pestyn ja pH-vakioidun mikrosuodostuskonsentraatin kuvaus suihke-, tyhjö- ja kylmäkuivaimilla. Lisäksi laitteistoa voidaan käyttää mikrosuodatetun ja ultrasuodatuksella konsentroidun herakonsentraatin valmistukseen sekä herakonsentraatin valmistukseen, josta on poistettu laktoosi ja suolat osittain tai kokonaan. Kaikki edellä mainitut tuotteet voivat olla liuoksena tai kuivattuina.

20 Ydinprosessin toinen laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Herakonsentraatin proteiinit ovat jaoteltavissa sulfonoinnin jälkeen useampaan osaan kuin vain kahteen, saostumaan ja liukoiseen osaan. Vaihtelemalla sulfonointiastetta ja saostus-pH:ta voidaan konsentraatin proteiinit saostaa useana eri osana, jolloin saostumien ja liukoisen osan proteiinikoostumus ovat määriteltävissä suhteellisen tarkasti. Ks. kuva 3.

30 Prosessin alkuosa on samanlainen kuin ensimmäisessä laajennuksessa. Halutu sulfonointiaste voidaan määritellä tarkasti edellä esitetyillä sulfonointiin vaikuttavilla tekijöillä. Saostamiset puolestaan voidaan tehdä esimerkiksi kolmessa pH:ssa 5,0, 4,5 ja 4,0. Ensimmäisen saostamisen pH:ssa 5,0 saostuma erotetaan mikrosuodattamalla säiliöön 10. Mikrosuodos johdetaan suoraan tai suodossäiliön 12 kautta takaisin toiseen reaktoriin seuraavaa saostamista varten pH:ssa 4,5. Tarvittaessa mikrosuodatuksen suodos on konsentroidavissa säiliössä 12 käyttämällä ultrasuodatinta 17 ennen seuraavaa saostamista.

Toista saostamista tehtäessä pestäään säiliössä 10 oleva saostekonsentraatti mikrosuodattamalla. Pesty konsentraatti siirretään säiliöön 13 tai 12 ilman pesua jatkettessa käsittelyä välittömästi. Säiliössä 12 konsentraatin pH nostetaan haluttuun arvoon NaOH:lla säiliöstä 5a. Konsentraatti pestäään ultrasuodattamalla ultrasuodattimessa 17 ja väkevöidään sopivalle tasolle. Käsittelyn jälkeen konsentraatti siirretään säiliöön 19, josta se kuivataan, kuten edellä on selostettu tai käytetään sellaisenaan kuljetettuna suoraan käyttökohteeseen.

5 Toinen ja kolmas saostus edellä mainituissa pH:issa sekä saostuman käsittely konsentraatiksi tai kuivatuksi jauheeksi suoritetaan samoin kuin ensimmäisen saostukseen yhteydessä on kuvattu.

10 Viimeisen saostuksen suodos konsentroidaan, sen pH säädetään haluttuun arvoon ja se pestäään. Pesty konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivataan kuten edellä on kuvattu.

15 Ydinprosessin toisen laajennuksen yhteydessä käyttöön otetut uutuudet, joita aikaisemmin ei ole käytetty samassa yhteydessä ovat: herakonsentraatin proteiinit ovat jaoteltavissa useaan osaan eri käyttötarkoituksia varten saostamalla useassa pH:ssa, suodos on konsentroidavissa ennen seuraavaa saostusta, ja prosessin laitteistolla on suoritettavissa useita toimintoja samanaikaisesti, esimerkiksi saostaminen voidaan suorittaa samaan aikaan, kun edellistä saostumaa pestäään mikrosuodatuksella tai sitä 20 edellistä pestäään ja konsentroidaan pH:n säädön yhteydessä ultrasuodatuksella ennen kuivausta.

25 Kaikki jaottelussa tuotetut proteiinit ja niiden seokset ovat valmistettavissa ja saatavissa myös liukoisina.

30 Heran proteiinit ovat tunnetusti hyviä biologiselta arvoltaan. Saadut proteiinijakeet voidaan kohdentaa hyvin vaativiin erikoisruokiin, kuten α -laktalbumiini lastenruokiin (mm. Hambraeus, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins 1984, s. 63-79). Saostamisen yhteydessä pH lasketaan arvoon 5,0 ja sen alapuolelle, jolloin käytetyssä reaktiolämpötilassa rikkidioksidi vapautuu mm. sulfoniryhmistä ($-S-SO_3^-$) ja muodostuu vapaita sulfhydryyliryhmää (-SH). Sulfhydryyliryhmät pysyvät vapaina, ellei pH:ta nosteta lähelle 7:ää ja anneta hapen vaikuttaa niihin. Sulfhydryyliryhmät suojaavat monia ruoissa esiintyviä, raaka-aineissa olevia tai valmistuksessa syntyneitä, epäedullisia, jopa myrkkyllisiä yhdisteitä, mm. mykotokiinit ja lysinoalaniini, vastaan (mm. Friedman, J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 3-20). Proteiinien fraktioinnissa biologinen arvo ja ravintonäkökohdat ovat useimmiten ensisi-

jaisia. Lisäksi sulfonointiasteesta johtuvia toiminnallisia ominaisuuksia voidaan jossain määrin hyödyntää näissäkin yhteyksissä. Toisaalta eräiden proteiinien kuten β -laktoglobuliinin eristämisessä yhtenä näkökohtana on hyvät geeliytymis ominaisuudet.

5

Ydinprosessin kolmas laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Heran kokonaisproteiinien toiminnallisuuteen voidaan vaikuttaa sulfonointiasteella biologisen arvon huonontumatta. Sulfonointiasteen lisäyksellä, jonka seurauksena

10 molekyylirakenteen muuntuneisuus lisääntyy, vaikutetaan heran proteiinien moniin toiminnallisiin ominaisuuksiin joko parantamalla tai huonontamalla niitä. Tällaisia ominaisuuksia ovat mm. vaaltoavuus, vaahdon pysyvyys, viskositeetti, liukoisuus, emulgointikyky ja geeliytyvyys (mm. N.K.D. Kella, S.T. Yang & J.E. Kinsella 1989, J. Agric. Food Chem. 37, 1203-1210).

15 Proteiinien molekyylirakenteen pysyvyys edellyttää sulfoniryhmien olemassaoloa rakenteessa. Tämän seurauksena happamien olosuhteiden käyttö ei tule kysymykseen eristyksessä, joten eristysprosessin alkuosaa voidaan käyttää vain saostamiseen asti. Ks. kuva 4.

20 Valmistettaessa muunneltuja proteiineja, joiden tiettyjen hyvien toiminnallisten ominaisuuksien halutaan säilyvän, konsentraatti siirretään sulfonoinnin jälkeen säiliöön 10, jossa se tarvittaessa voidaan mikrosuodattaa, ja sen jälkeen säiliöön 12, jossa se puolestaan konsentroidaan, sen pH säädetään ja pidetään välillä 6-8, edullisimmin 6,5-7,5, ja pestään ultrasuodattamalla ultrasuodatinlaitteella 17. Pesty ja pH-vakioitu konsentraatti siirretään säiliöön 19, josta se kuljetetaan sellaisenaan käyttöpaikalle tai johdetaan kuivaimeen 20 kuivausta varten. Valmis tuote, proteiinijauhe, varastoidaan varastoon 21.

25 Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 18. Muut pesuvedet johdetaan viemäriin. Säiliössä 18 oleva suodos ja pesuvedet johdetaan vapaaseen reaktoriin, sen pH lasketaan 4,5:een ja se lämmitetään tavallisesti käytettyyn prosessilämpötilaan. Näissä olosuhteissa puhalletaan vapautunut rikkidioksidi inertillä ja steriloidulla kaasulla säiliöstä 8 talteenottosäiliöön 9, jossa se neutraloidaan NaHSO_3 :ksi NaOH :lla säiliöstä 5a. Käsitelty suodos siirretään säiliöön 18 hyödynnettäväksi esimerkiksi fermentoimalla.

30 Proteiinien allergenisia ominaisuuksia voidaan jossain määrin vähentää lyhentämällä peptidien pituutta. Myös proteiinien toiminnallisia ominaisuuksia voidaan

tietyissä määrin muunnella pienentämällä molekyylien kokoa. Prosessiin on sijoitettu membraanireaktori 22 proteiinien entsymaattista hydrolyysiä varten. Membraanireaktorissa proteiinit ovat hydrolysoitavissa halutun kokoisiksi peptideiksi ennen kuivausta tai käyttöä sellaisenaan.

5 Ydinprosessin kolmannessa laajennuksessa käytöön otetut uutuudet ovat: halutussa määrin sulfonioitu konsentraatti tarvittaessa mikrosuodatetaan ja suodatettu konsentraatti konsentroidaan edelleen ultrasuodattamalla, sen pH säädetään halutuksi ja se pestäään; proteiinien molekyylikokoa voidaan toiminnallisten ominaisuuksien tai muiden syiden vaatiessa pienentää hydrolysoimalla ennen kuivausta. Hydrolysaatti 10 on käytettävissä myös liuoksena.

Pääosa edellä esitellyistä uutuksista on esitetty edellisessä menetelmää koskevassa patentihakemukseissa, mutta tietyt tärkeät menetelmän osat ovat uusia ja luetellaan jäljempänä. Tässä hakemukseissa kuvataan uutuutena menetelmän toteuttamiseen tarvittava väline, valmistusprosessi. Tähän hakemukseen kuuluu useamman pH:n 15 saostus fraktointimielessä ja fraktoiden tuottaminen liuoksina tai kuivattuna sekä sulfonoidun konsentraatin mikrosuodatus ja sen jälkeen konsentointi, pH:n vakointi ja pesu ennen tuotteeksi saattamista liuoksena tai kuivattuna jauheena. Saostus jää siis kokonaan pois. Kysymyksessä on heran koko proteiiniosan tietyjen toiminnallisten ominaisuuksien parantaminen. Menetelmän osana on mukana proteiinien entsymaattinen hydrolysointi peptidikoon pienentämiseksi ennen konsentraatin tuoteksi saattamista liuoksena tai kuivattuna jauheena.

Selitykset kuvien 1-4 prosessikaavioihin

1. Heran varastosäiliö: Hera johdetaan heräsäiliöön juustonvalmistuksesta rasvan poiston jälkeen.
- 25 2. Mikrosuodatuslaitteisto: Herasta suodatetaan pois mikrosuodatuksella kaseiinihiukkaset, bakteerit ja osa fosfolipoproteiineja pidätteenä.
3. Pidätesäiliö: Pidäte johdetaan erilliseen säiliöön.
- 4 ja 5. Reaktorit: Mikrosuodatuksen suodos johdetaan vuorotellen molempien reaktoreihin, joissa se väkevöidään ultrasuodattamalla. Reaktoreissa tapahtuu proteiinien muuntelu sulfonioimalla ja saostus.
- 30 4a ja 5a. Hoppo- ja emässäiliöt pH:n säätölaitteineen: Säiliöt sisältävät hoppoa ja emästä pH:n muutosta ja tasausta varten.

A ja B. Reagenssien 1 ja 2 säiliöt ja annostelulaitteisto: Säiliöt sisältävät reagensseja 1 ja 2, joita käytetään proteiinien muuntelussa. Säiliöiden yhteydessä on myös reagenssien annostelulaitteet.

- 5 6. Ultrasuodatuslaitteisto: Mikrosuodatuksen suodos väkevöidäään ultrasuodattamalla reaktoreihin.
7. Suodossäiliö: Ultrasuodatuksen suodos johdetaan sivutuotteena suodossäiliöön jatkotoimenpiteitä varten.
- 10 8. Kaasusäiliö: Rikkidioksidin puhallus tapahtuu puhaltamalla reaktoreihin steriiliä inerttiä kaasua, ilmaa/typpeä, jolla ajetaan vapautunut rikkidioksidei ulos saosteesta.
9. Rikkidioksidin talteenottosäiliö: Puhallettu kaasu ja sen mukana tuleva vesihöyry sekä $\text{SO}_2/\text{SO}_3^{2-}$ otetaan talteen uudelleenkäyttöä varten. Näin estetään SO_2 :ta joutumasta ympäristöön ja suodoksen jatkokäsittelyssä aiheuttamasta vahinkoa mm. hyötymikrobeille.
- 15 10. Saostesäiliö: Reaktoreista saoste johdetaan saostesäiliöön, johon se konsentroidaan mikrosuodattamalla.
11. Mikrosuodatuslaitteisto: Saoste konsentroidaan ja pestään mikrosuodattamalla. Konsentraatti muodostuu saostesäiliöön 10 ja suodos sekä ensimmäiset pesuvedet johdetaan suodossäiliöön 12. Toiset pesuvedet johdetaan viemäriin.
- 20 12. Suodossäiliö: Saosteen mikrosuodatuksessa muodostunut suodos johdetaan suodossäiliöön.
13. Saostekonsenraation säiliö: Väkevöity saoste johdetaan saostekonsenraatin säiliöön, josta se otetaan jatkokäsittelyyn, separointiin, tai siirretään ultrasuodatukseen, säiliöön 12.
- 25 14. Sentrifugi, separaattori: Saostekonsenraatti sentrifugoidaan, separoidaan, proteiinien erottamiseksi tahnana. Proteiinit siirretään sekoittimeen 15 ja kirkaste päästetään viemäriin.
15. Sekoitin: Proteiinitahnaa sekoitetaan sekoittimessa ja samassa yhteydessä sen pH nostetaan haluttuun arvoon.
- 30 16. Tuotevarasto: Valmis ja vakioitu proteiinitahna siirretään varastoon 16.

17. Ultrasuodatuslaitteisto: Mikrosuodatussuodoksen väkevöinti, pH:n säätö ja pesu tapahtuvat ultrasuodattamalla säiliöön 12.
18. Ultrasuodossäiliö: Ultrasuodatuksen suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 18. Seuraavat pesuvedet päästetään viemäriin.
- 5 19. Ultrasuodatuskonsentraatin säiliö: Ultrasuodatuskonsentraatti siirretään suodossäiliöstä 12 konsentraattisäiliöön 19.
20. Kuivain: Kyseeseen tulee suihke-, tyhjö- tai kylmäkuivain. Sillä kuivataan ultrasuodatuskonsentraatti proteiinijauheeksi.
21. Proteiinijauhevarasto: Proteiinijauhe varastoidaan jatkokäsittelyä varten.
- 10 22. Membraanireaktori proteiinihydrolyysiä varten: Ultrasuodatus- ja saoste-konsentraatti sekä muut proteiinit voidaan hydrolysoida halutun kokoisiksi peptideiksi ennen kuivaamista.
23. Hydrolysaatin varastosäiliö: Hydrolysaatti varastoidaan ennen kuivausta tai käyttöä.

Patenttivaatimukset

1. Prosessi pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinien eristämiseksi, joka sisältää vaiheet, joissa
 - a) suoritetaan heran esikäsittely, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,
 - b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely, ja
 - c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka ainakin käsittää heran sulfonointujen proteiinien erottamisen em. käsitellystä herasta konsentroimalla ne, saostamalla ne ja/tai suorittamalla niille fraktiosaaostus,
- 5 10 tunnettu siitä, että esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely b) suoritetaan siten, että esikäsitely hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoiuvat.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe b) käsittää toisistaan riippumatta sen, että
 - käytetään sulfiittina alkalimetallin ja/tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabisulfiittia, edullisesti natriumsulfiittia, natriumvetysulfiittia ja/tai natriummetabisulfiittia, edullisimmin natriumvetysulfiittia,
 - käytetään sellaista sulfiittimäärää, että sulfiitin konsentraatio sulfonointiseoksessa on välillä noin 0,02-0,20 M, edullisesti välillä noin 0,05-0,10 M,
 - käytetään elintarvikelaatuisena hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksidiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia CaO_2 ja/tai kaliumbromaattia KBrO_3 , ja että
 - käytetään sellaista elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä, että elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen pitoisuus on välillä 0,01-0,15 % (paino/tilavuus), laskettu aktiivisena happena, ja lisäksi sen, että
 - saatetaan esikäsitely hera kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa pH:ssa noin 5,0-8,5 ja
 - saatetaan esikäsitely hera kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti lämpötilassa noin 30-50°C.
- 20 25 30 35 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaiheen b) sulfonointikäsittely käsittää vaiheet, joissa:
 - b₁) proteiinit sulfonoidaan saattamalla esikäsitely hera kosketukseen sulfiitin kanssa ja

b₂) sulfonoidut proteiinit hapetetaan saattamalla ne kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe b₁) käsittää toisistaan riippumatta sen, että

- saatetaan esikäsitylty hera kosketukseen sulfiitin kanssa pH:ssa noin 6,0-7,5, edullisesti pH:ssa noin 6,5-7,0,
- saatetaan esikäsitylty hera kosketukseen sulfiitin kanssa noin 10-50 minuutin ajan, ja
- 10 - saatetaan esikäsitylty hera kosketukseen sulfiitin kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti noin 30-50°C, ja vaihe b₂) käsittää toisistaan riippumatta sen, että
- saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa pH:ssa noin 5,0-7,0, edullisesti pH:ssa noin 5,5-6,5,
- saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa noin 15-60 minuutin ajan, ja
- 15 - saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti noin 30-50°C.

5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että

20 vaihe c) käsittää sulfonioitujen proteiinien erottamisen esikäsityllystä herasta lisäkonsentroimalla, edullisesti ultrasuodattamalla ja edullisesti pH:ssa 6-8, jolloin saadaan talteen oleellisesti kaikki sulfonoidut proteiinit yhdessä käsittävä konsentraatti.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe c) käsittää toisistaan riippumatta

25 - käsityllyssä herassa olevien sulfonioitujen proteiinien puhdistamisen mikrosuodatuksella, edullisesti ennen konsentrointia,

- konsentraatin hydrolysoinnin, edullisesti entsymaattisesti, jolloin syntyy kokohraproteiinihydrolysaattia,

30 - konsentroimalla käsityllystä herasta erottujen sulfonioitujen proteiinien tai niiden hydrolysoinnista syntyvän kokohraproteiinihydrolysaatin kuivaamisen kiinteäksi tuotteeksi,

- rikkijohdannaisten poistamisen käsityllystä herasta, josta sulfonoidut proteiinit on erottettu, alentamalla pH, edullisesti ≤ 5 , ja lämmittämällä, edullisesti lämpötilaan noin 30-50°C, jolloin rikkioksidijohdannaiset muuttuvat rikkidioksidikaaksi, joka poistetaan ja edullisesti neutraloidaan prosessissa käyttökelpoiseksi sulfiitiksi kuten natriumvety.sulfiitiksi.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonioitujen proteiinien erottamisen käsittelystä herasta saostamalla happamassa pH:ssa, jolloin syntyvä sakka sisältää ko. pH:ssa liukenevottomat proteiinit (esim. α -laktalbumiini, naudanseerumialbumiini BSA) ja jävä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit (esim. β -laktoglobuliini), ja erottamalla sakka vesifaasista.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että sakka erotetaan sentrifugiseparaattorilla.

10

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää toisistaan riippumatta sen, että

- erotetaan sulfonoidut proteiinit saostamalla pH:ssa noin 2,5-6,5, edullisesti pH:ssa noin 3,0-5,0,

15

- erotetaan sulfonoidut proteiinit saostamalla lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti lämpötilassa noin 30-50°C,
- erotetaan sulfonoidut proteiinit siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 minuutin aikana, vaiheen b) pH-arvosta vaiheen c) sulfonioitujen proteiinien saostus-pH-arvoon, edullisesti viimeksi mainitun pH-arvon alarajaan,

20

- suoritetaan saosteen sekoitus pH:n happamaksi säätämisen jälkeen, edullisesti noin 10-60 min, ja että
- happamassa pH:ssa oleva saoste (sakka + vesifaasi) konsentroidaan mikrosuodattamalla, edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, jolloin sakka erottuu ainakin osasta käsiteltyä heraa.

25

10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe b) ja vaihe c) käsittävät sulfonioitujen proteiinien erottamisen saostamalla happamassa pH:ssa vuorotellen vähintään kahdessa astiassa, edullisesti siten, että vaihe b) ja vaihe c) tehdään kahdessa astiassa vuorotellen, tai siten, että vaiheiden b) ja c) täytö-, tyhjennys- ja erottusoperaatiot vuorottelevat vaiheiden pääoperaatioiden (sulfonointi, saostus) kanssa tai siten, että erottusoperaatio vuorottelee em. pääoperaatioiden muodostaman peräkkäiskokonaisuuden kanssa.

30

11. Jonkin patenttivaatimuksista 8-10 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää saostuksen happamassa pH:ssa, vapautuvan rikkidioksidin erottamisen ja talteenoton, edullisesti johtamalla saostusseokseen inerttikaasua, joka kuljettaa rikkidioksidin säiliöön, jossa se muutetaan rikkihapokkeksi ja mielellään neutraloi-

35

daan, mieluimmin NaOH:lla prosessissa uudelleen käyttökelpoiseksi NaHSO₃:ksi, joka syötetään sulfiitiksi takaisin vaiheeseen b).

12. Jonkin patenttivaatimuksista 8-11 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe 5 c) käsittää ainakin yhden seuraavista loppukäsittelyvaiheista

- saoste tai sen pesty konsentraatti konsentroidaan proteiinitahnaksi, edullisesti käyttäen sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta ja valinnaisesti,
- proteiinitahnaa sekoitetaan ja/tai säädetään sen pH:ta, edullisesti arvoon 6-8 emäksellä tai emässeoksella, joka edullisesti on NaOH tai NaOH:n, Ca(OH)₂:n ja KOH:n seos, jolloin CaOH:n määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen Ca:n määrän,
- saostuksen ja sakan erotuksen jälkeisen suodoksen sisältämien ko. pH:ssa liukoisten sulfonioitujen proteiinien (esim. β -laktoglobuliini) talteenoton, edullisesti ultrasuodatuksella, ja mahdollisen jatkokäsittelyn, kuten konsentroinnin, pH-säädön, pesun hydrolyysin ja/tai kuivauksen.

13. Jonkin patenttivaatimuksista 8-12 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonioitujen proteiinien erottamisen käsittelystä herasta ja toisistaan 20 fraktiosaostamalla useassa happamassa pH:ssa, jolloin ensimmäisessä saostuksessa ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvä sakka, joka sisältää ko. pH:ssa liukenevät proteiinit, erotetaan, edullisesti sentrifugoimalla ja/tai mikrosuodattamalla, ja otetaan talteen, ja ko. pH:ssa syntyvälle vesifaasille eli suodokselle tai sen konsentraatille, joka sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit, suoritetaan toinen saostus 25 toisessa happamassa pH:ssa, erotetaan ja otetaan talteen, jne., kunnes saadaan talteen kutakin hapanta saostus-pH:ta vastaavat sakat, joissa on vastaavat proteiinit, ja kaikkien saostuksien jälkeen jäävä vesifaasi, jossa on kaikissa saostus-pH:issa liukoisena säilyneet proteiinit, jotka voidaan eristää konsentroimalla ja kuivaamalla.

30 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonioitujen proteiinien erottamisen saostamalla kahdessa tai kolmessa happamassa, edullisesti alenevassa pH:ssa, edullisesti pH:ssa noin 5,0, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä α -laktalbumiinista, pH:ssa noin 4,5, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä naudanseerumialbumiinista (BSA), ja pH:ssa noin 4,0, jolloin saostuu esim. loput naudanseerumialbumiinista ja muut 35 happamassa saostuvat proteiinit, mainitussa järjestyksessä, jolloin jäljelle jää vesifaasi eli käsittelyn heran se osa, jossa on ainakin ko. kolmessa saostus-pH:ssa liukoisena säilyneet proteiinit, esim. β -laktoglobuliini.

Patentkrav

1. Process för isolering av proteiner ur vassla som innehåller huvudsakligen vatten, laktos och proteiner, innehållande stegen där
 - a) vasslan förbehandlas, vilket åtminstone innehåller koncentrering av vasslan
 - 5 genom avlägsning av 75-95 % av dess vatten,
 - b) den förbehandlade vasslan ur steg a) sulfoneringsbehandlas, och
 - c) den för- och sulfoneringsbehandlade vasslan ur steg b) behandlas, varvid vasslans sulfonerade proteiner åtminstone separeras ur ovannämnda behandlade vassla genom koncentrering, utfällning och/eller fraktionsutfällning av dessa,
- 10 kännetecknad av att sulfoneringsbehandlingen b) av den förbehandlade vasslan genomförs så, att den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfit och en oxiderande förening av livsmedelskvalitet utan katalysator, varvid vasslans proteiner sulfoneras.
- 15 2. Process enligt patentkrav 1, kännetecknad av att steg b) innehåller oberoende av varandra det, att
 - som sulfit används en alkalimetall- och/eller alkalisk jordartsmetallsulfit, en vätesulfit och/eller metabisulfit, företrädesvis natriumsulfit, natriumvätesulfit och/eller natriummetabisulfit, helst natriumvätesulfit,
 - 20 - en sådan mängd sulfit användes, att sulfitkoncentrationen i sulfoneringsblandningen är mellan cirka 0,02-0,20 M, företrädesvis mellan cirka 0,05-0,10 M,
 - som den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet användes en peroxidförening och/eller ett halogenat av livsmedelskvalitet, företrädesvis kalciumperoxid CaO_2 och/eller kaliumbromat KBrO_3 , och att
- 25 - en sådan oxiderande förening av livsmedelskvalitet användes, att halten av oxiderande förening av livsmedelskvalitet är 0,01-0,15 % (vikt/volym), räknat som aktivt syre, och dessutom att
 - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten och den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i ett pH-värde om cirka 5,0-8,5 och
- 30 - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten och den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i en temperatur om cirka 25-55°C, företrädesvis temperaturen cirka 30-50°C.
- 35 3. Process enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknad av att stegets b) sulfoneringsbehandling innehåller stegen där:
 - b₁) proteinerna sulfoneras genom att bringa den förbehandlade vasslan i kontakt med sulfiten och
 - b₃) de sulfonerade proteinerna oxideras genom att bringa dem i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet.

4. Process enligt patentkrav 3, kännetecknad av att steg b₁) innehåller oberoende av varandra att

- den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i ett pH av cirka 6,0-7,5, företrädesvis pH-värdet cirka 6,5-7,0,

5 - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i cirka 10-50 minuter, och

- den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i en temperatur av cirka 25-55°C, företrädesvis cirka 30-50°C, och b₂) innehåller oberoende av varandra att

- de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av

10 livsmedelskvalitet i ett pH av cirka 5,0-7,0, företrädesvis i ett pH av cirka 5,5-6,5,

- de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i cirka 15-60 minuter, och

- de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i en temperatur av cirka 25-55°C, företrädesvis cirka 30-50°C.

15

5. Process enligt något av de föregående patentkraven, kännetecknad av att steg c) innehåller separering av de sulfonerade proteinerna från den förbehandlade vasslan genom vidarekoncentrering, företrädesvis ultrafiltrering och företrädesvis vid ett pH av 6-8, varvid ett koncentrat tillvaratas som innehåller väsentligen alla sulfonerade proteiner.

6. Process enligt patentkrav 5, kännetecknad av att steg c) innehåller oberoende av varandra

- en rening av de i vasslan befintliga sulfonerade proteiner genom mikrofiltrering, företrädesvis före koncentreringen,

25 - en hydrolysering, som företrädesvis är enzymatisk, av koncentratet, varvid helvassleproteinhydrolysat bildas,

- koncentrering av de ur den behandlade vasslan separerade sulfonerade proteinerna eller det ur deras hydrolysering bildade helvassleproteinhydrolysatet genom torkning till en torr produkt,

30 - avlägsning av svavelderivat ur den behandlade vasslan från vilken de sulfonerade proteinerna separeras, genom sänkning av pH-värdet, företrädesvis ≤ 5 , och genom uppvärmning, företrädesvis till temperaturen cirka 30-50°C, varvid svaveloxidderivaten konverteras till svaveldioxidgas som avlägsnas och företrädesvis neutraliseras till i processen användbar sulfit såsom natriumvätesulfit.

35 7. Process enligt något av patentkraven 1-4, kännetecknad av att steg c) innehåller separering av de sulfonerade proteinerna ur den behandlade vasslan genom utfällning i sur pH, varvid den erhållna fällningen innehåller vid nämnda pH olösliga proteiner (t.ex. α -laktalbumin, boskapsserumalbumin (BSA) och den åter-

stående vattenfasen innehåller vid nämnda pH lösliga proteiner (t.ex. β -lakto-globulin), och genom separering av fällningen ur vattenfasen.

8. Process enligt patentkrav 7, kännetecknad av att fällningen separeras medelst 5 en centrifugseparator.

9. Process enligt patentkrav 8, kännetecknad av att steg c) innehåller oberoende av varandra att

- de sulfonerade proteinerna separeras genom utfällning vid pH-värdet cirka 2,5-6,5, 10 företrädesvis pH-värdet cirka 3,0-5,0,

- de sulfonerade proteinerna separeras genom utfällning vid temperaturen cirka 25- 55°C, företrädesvis temperaturen cirka 30-50°C,

- de sulfonerade proteinerna separeras genom långsam övergång, företrädesvis under 15 10-40 minuter, från steget b) pH-värde till steget c) pH-värde för utfällning av de sulfonerade proteinerna, företrädesvis till den nedre gränsen av sistnämnda pH-värde,

- en blandning av utfällningen efter inställningen av surt pH genomförs, företrädesvis under cirka 10-60 minuter, och att

- den vid surt pH befintliga utfällningen (fällningen + vattenfasen) koncentreras

20 genom mikrofiltrering, företrädesvis före isolering av fällningen ur utfällningen eller dess med en annan metod erhållna koncentrat, varvid fällningen separeras från åtminstone en del av den behandlade vasslan.

10. Process enligt patentkrav 8 eller 9, kännetecknad av att steg b) och steg c)

25 innehåller separering av de sulfonerade proteinerna genom utfällning vid surt pH turvis i åtminstone två kärl, företrädesvis så, att steg b) och steg c) utförs turvis i två kärl, eller så, att stegens b) och c) fyllnings-, tömnings- och separeringsoperationer turas om med stegens huvudoperationer (sulfonering, utfällning) eller så, att separeringsoperationen turas om med en successiv helhet bestående av nämnda huvudoperationer.

30 11. Process enligt något av patentkraven 8-10, kännetecknad av att steg c) innehåller en utfällning vid surt pH, en separering och tillvaratagning av den frigjorda svaveldioxiden, företrädesvis genom att i utfällningsblandningen leda inertgas, som

35 transporterar svaveldioxiden till en behållare, där den konverteras till svavelsyrlighet och gärna neutraliseras, helst med NaOH till i processen återanväntbart NaHSO₃, vilket återmatas som sulfit till steg b).

12. Process enligt något av patentkraven 8-11, kännetecknad av att steg c) innefattar åtminstone ett av följande slutbehandlingssteg

- utfällning eller ett tvättat koncentrat därav koncentreras till proteinpasta, företrädesvis medelst en centrifugseparator, ett remfilter och/eller ett trumfilter och eventuellt,
- 5 - proteinpastan blandas och/eller regleras till önskat pH, företrädesvis till värdet 6-8 medelst en bas eller basblandning, som företrädesvis är NaOH eller en blandning av NaOH, Ca(OH)₂ och KOH, varvid mängden CaOH helst är sådan, att den åtminstone ersätter vasslans ursprungliga mängd Ca,
- 10 - de i utfällningen eller i filtratet efter separeringen befintliga och vid nämnda pH lösliga sulfonerade proteinernas (t.ex. β -laktoglobulin) tillvaratagning, företrädesvis genom ultrafiltrering, och eventuell vidarebehandling, såsom koncentrering, pH-reglering, tvättning, hydrolysis och/eller torkning.

15 13. Process enligt något av patentkraven 8-12, kännetecknad av att steg c) innefattar en separering av de sulfonerade proteinerna ur den behandlade vasslan och varandra genom fraktionsutfällning vid flera sura pH, varvid i den första utfällningen den fällning, som bildas i det första sura pH och därmed innehåller de vid nämnda pH olösliga proteinerna, separeras, företrädesvis genom centrifugering och/

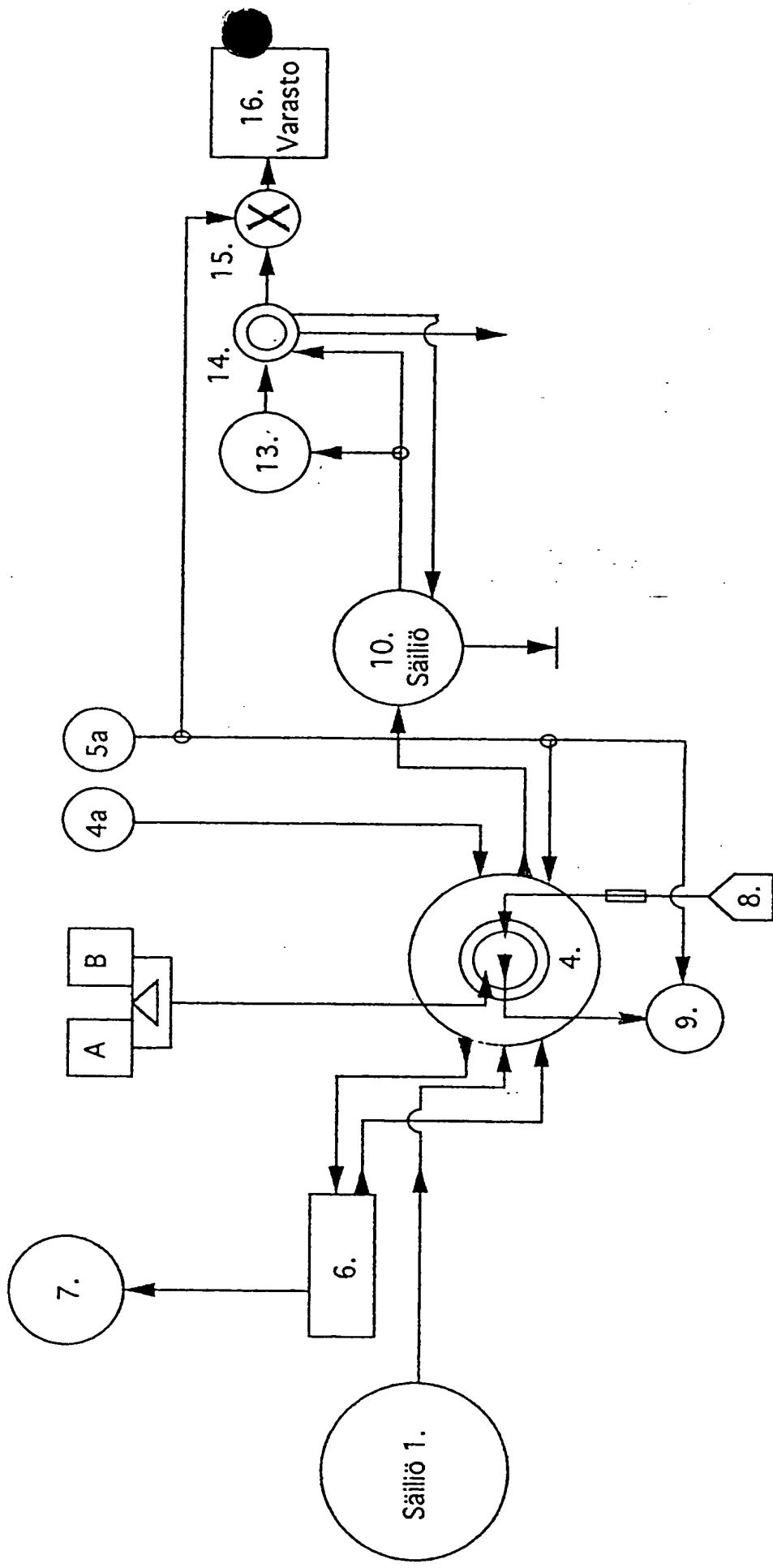
20 eller mikrofiltrering, och tillvaratages, och med det i nämnda pH bildade vattenfasen, mao. filtratet eller ett koncentrat därav, innehållande i nämnda pH lösliga proteiner, utförs en andra utfällning vid ett annat surt pH, separeras och tillvaratages, osv., tills följande komponenter tagits till vara: de fällningar och proteiner, vilka motsvarar varje sura utfällnings-pH, samt den efter alla utfällningar kvarblivna

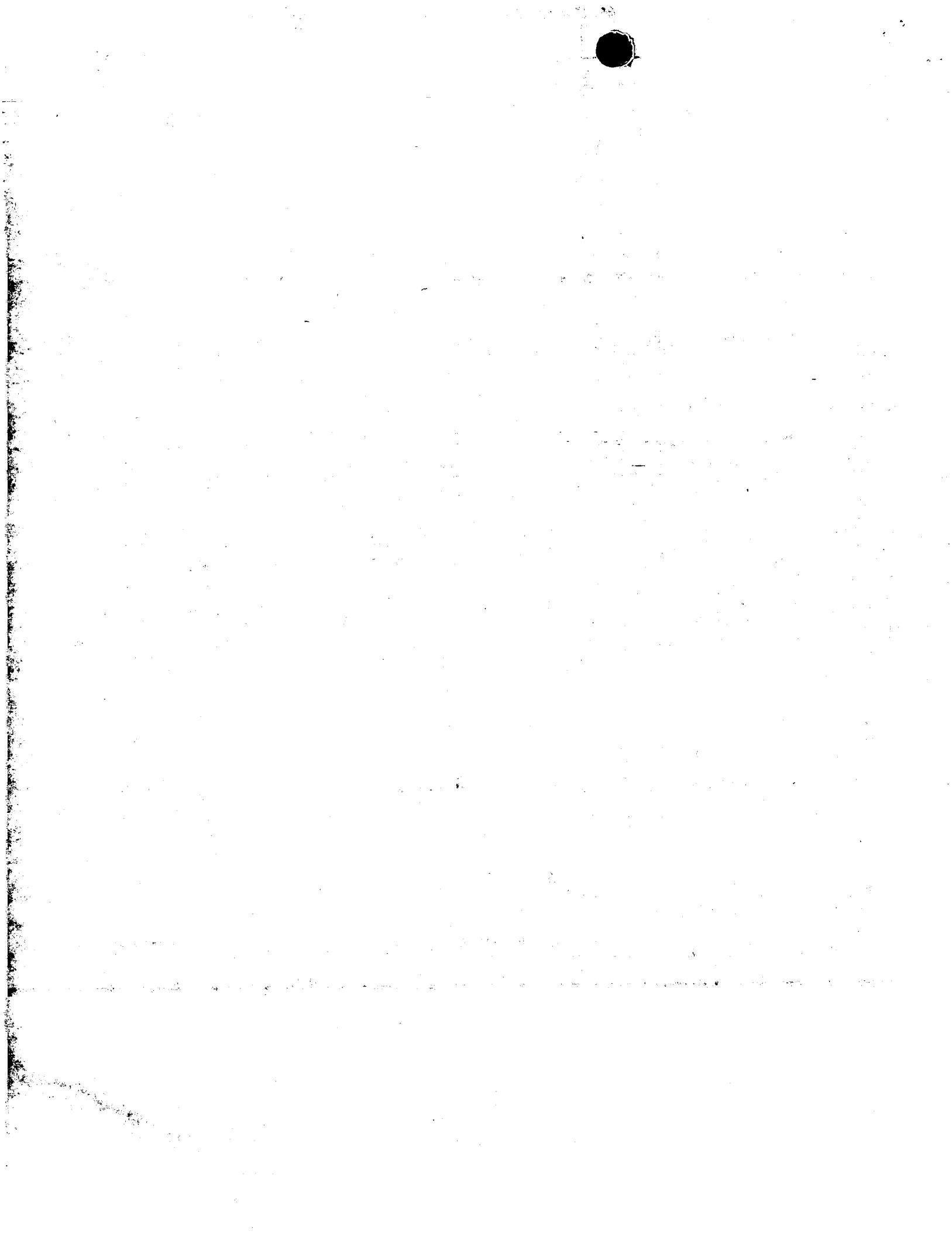
25 vattenfasen som innehåller vid alla utfällnings-pH lösliga förblivna proteinerna, vilka kan isoleras genom koncentrering och torkas.

14. Process enligt patentkrav 13, kännetecknad av att steg c) innehåller separering av de sulfonerade proteinerna genom utfällning i två eller tre sura, företrädesvis sjunkande pH, företrädesvis vid pH cirka 5,0, varvid t.ex. en väsentlig del av vasslans α -laktalbumin utfaller, vid pH cirka 4,5, varvid t.ex. utfaller en väsentlig del av vasslans boskapsserumalbumin (BSA), och vid pH cirka 4,0, varvid t.ex. utfälles resten av boskapsserumalbuminet och de övriga i surt medium utfallande proteinerna, i nämnda ordning, varvid kvar blir en vattenfas, mao. den del av den behandlade vasslan, som innehåller proteiner, t.ex. β -laktoglobulin, som förblivit lösliga i nämnda tre utfällnings-pH.

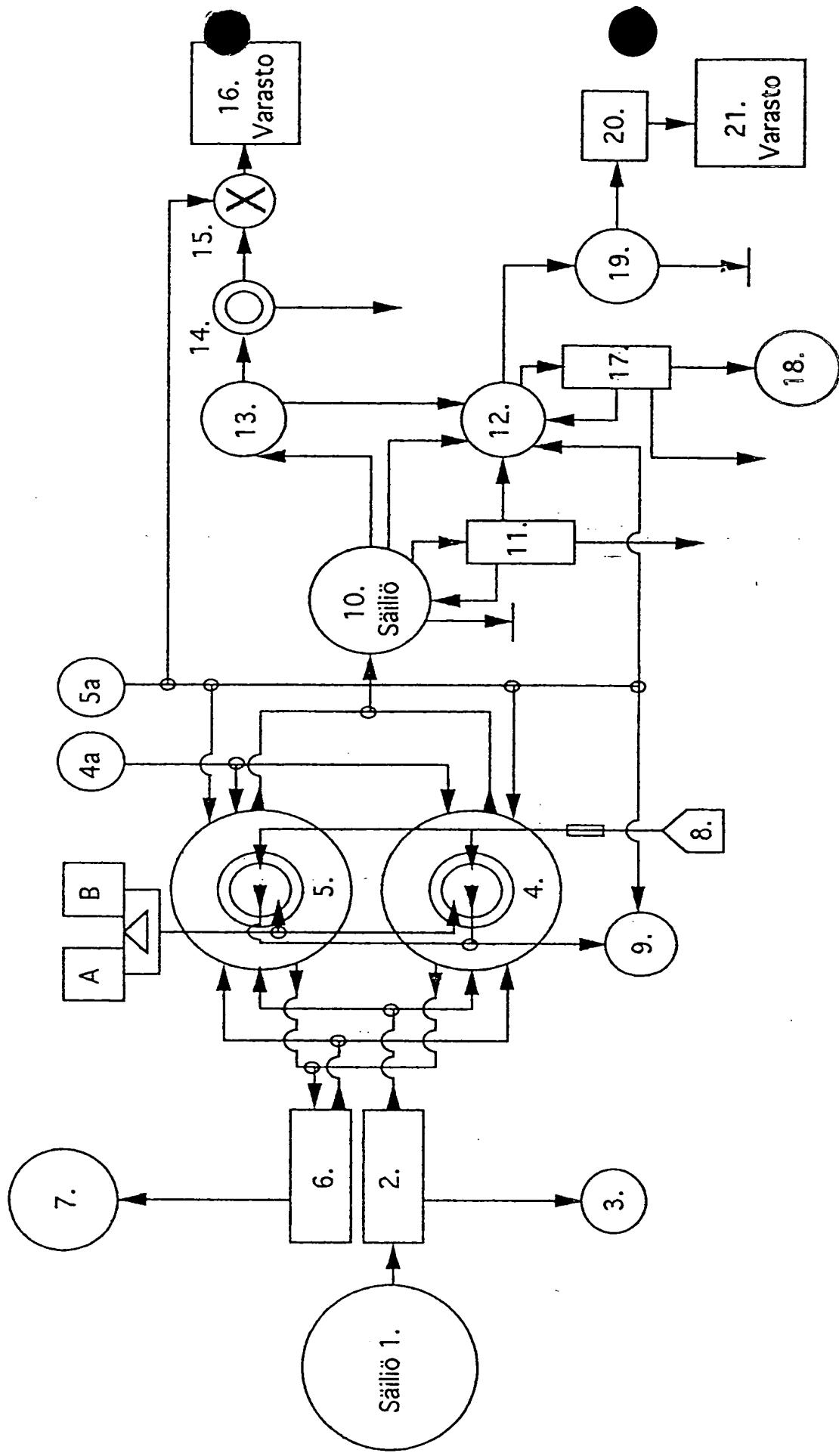


Hefaproteiinin eristys ja kästtely: ydinprosessi



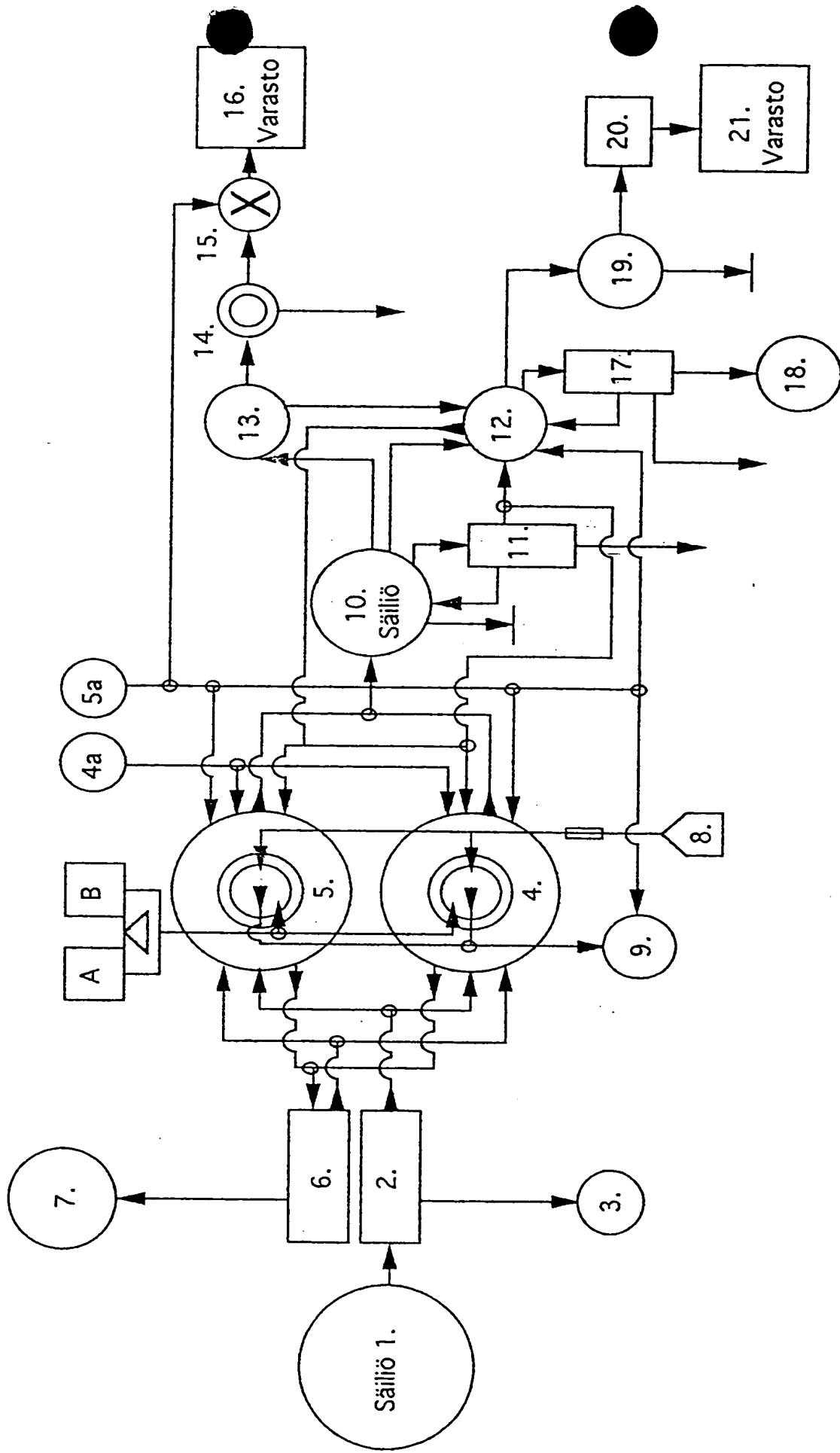


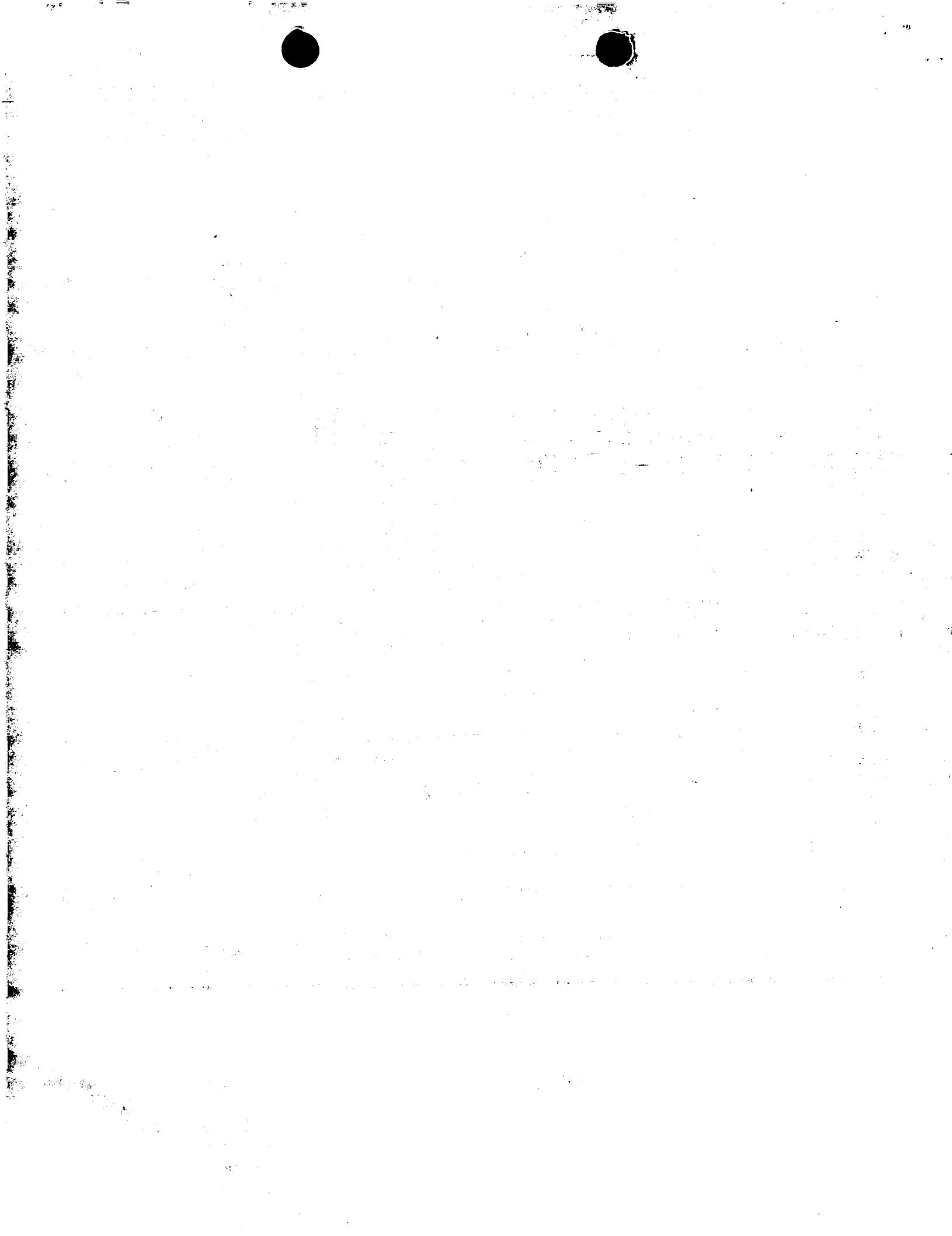
Heraproteiinien eristys ja käsite: ydinprosesi ja ensimmäinen laajennus



Heraproteiinin eristys ja käsittely: ydinprosessi sekä ensimmäinen ja toinen laajennus

101514





Hieraproteiinien eristys ja käsittely: ydinprosessi ja
kolme laajennusta

10151.

